

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

BIOCOMPATIBILITÉ, BIODÉGRADATION ET INFLUENCE DE LA
STÉRILISATION SUR LE COMPLEXE CHITOSANE-XANTHANE

FATIHA CHELLAT

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES (M.SC.A)
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

NOVEMBRE 1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-48844-6

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE

Ce mémoire intitulé

BIOCOMPATIBILITÉ, BIODÉGRADATION ET INFLUENCE DE LA
STÉRILISATION SUR LE COMPLEXE CHITOSANE-XANTHANE

Présenté par : CHELLAT Fatiha

En vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

A été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. SAVARD Pierre, Ph.D., président

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. CHORNET Esteban, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. RIVARD Charles-Hilaire, M.D., membre et codirecteur de recherche

M. FERNANDEZ Julio, M.D., membre

À Celia, mon amour éternel inconditionnel.

À Hamid.

À mes parents.

Remerciements

Tout d'abord, mes remerciements sincères au professeur Yahia qui m'a donné l'opportunité de faire partie de son groupe de recherche, grâce à quoi j'ai pu m'ouvrir sur le monde des biomatériaux dans le domaine biomédical.

Au professeur Dumitriu qui m'a initiée au monde des polymères et au professeur Chornet qui m'a permis d'intégrer son laboratoire au sein du département de Génie Chimique de l'Université de Sherbrooke.

Mes remerciements au Dr. Rivard qui m'a ouvert les portes de son laboratoire au Centre de Recherche de l'hôpital Sainte Justine.

Ma reconnaissance à Dr. Tabrizian pour son implication, soutien et encouragements tout au long de mon travail.

À Dr. Sirois pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à l'Institut de Pharmacologie du CUSE à Sherbrooke, au début de mes expérimentations.

Mes remerciements pour Dr. Savard et Dr. Fernandez qui ont gracieusement accepté de faire partie du jury.

À Mr. Magny pour son aide dans les analyses de microscopie électronique.

Au Dr. Bergeron du Département de Chimie de l'Université de Montréal pour son aide et conseils durant les analyses HPLC et au Pr. Harmand pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Au docteur Manuel Monleon Pradas pour son aide dans les analyses de DMTA et sa collaboration.

À Francis Boudreault pour son aide dans la réalisation des tests mécaniques.

À Souad Rhalmi pour nos fructueuses discussions et sa sympathie.

À Sylvie Charette pour son aide pendant les études histologiques et avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler.

Mes remerciements particuliers pour mesdames Louise Clément et Diane Giroux pour leur sympathie.

À tout le personnel et étudiants du GRBB.

Résumé

Les hydrogels possèdent des propriétés intéressantes conférées par leur structure en réseau leur permettant une grande rétention d'eau sans conduire à leur dissolution. Ce qui fait d'eux des matériaux utilisables comme systèmes de libération contrôlée de médicaments. Ils ont l'avantage d'être éliminables du corps, après administration, grâce à leur dégradation. Ceci permet de ne pas avoir recours à des procédures invasives pour les retirer. Parmi eux, nous avons étudié le complexe polyelectrolyte chitosane-xanthane (Ch-X) formé par les polysaccharides chitosane et xanthane. Ces derniers possèdent des charges opposées qui permettent des interactions ioniques et donc, la complexation.

Plusieurs études ont porté sur l'utilisation du chitosane et du xanthane dans le domaine biomédical comme polymères biocompatibles. Cependant le manque de travail sur les propriétés biologiques du complexe, nous a conduit à l'étude de sa biocompatibilité, biodégradation et des effets de la stérilisation sur ses propriétés physico-chimiques.

Les études de la biocompatibilité sont conduites en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo*. Dans le premier, nous avons évalué les effets cytotoxiques de particules de l'hydrogel et de leurs produits de dégradation sur des cellules fibroblastiques L-929, en utilisant le test MTT. De plus, la lignée cellulaire de macrophages J-774 est utilisée pour déterminer les réactions inflammatoires en mesurant la sécrétion de cytokines telles que

le $\text{TNF-}\alpha$ et l' $\text{IL-1}\beta$. La production de l'oxyde nitreux est aussi évaluée dans les surnageants cellulaires comme marqueur de l'activation des macrophages.

Les études *in vivo* sont effectuées par implantation de pastilles de Ch-X, en sous-cutané, au niveau dorsal, chez le rat Wistar mâle. Après des périodes allant de 1 à 12 semaines, des analyses histologiques sont utilisées pour évaluer les réactions tissulaires et cellulaires au matériau ainsi que sa dégradation.

La deuxième étape de notre travail a consisté à étudier la biodégradation de microsphères de Ch-X dans des milieux physiologiques simulés constitués de fluides gastrique et intestinal (FGS et FIS). Le PBS, une solution tampon saline, est utilisé comme contrôle possédant un pH neutre et libre d'enzymes. Les échantillons sont collectés durant le processus de dissolution à différents intervalles. Les analyses par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ont été réalisées après 1, 3, 5, 7, 15, 21 et 30 jours. Le taux de biodégradation est estimé par la mesure des aires de pics de glucosamine (GA) et de N-Acetyl-glucosamine (N-Ac-GA). Ceci nous a permis de quantifier la cinétique de biodégradation dans les milieux utilisés. Une étude comparative parallèle entre la dégradation du complexe et du chitosane est établie.

Durant la troisième partie de ce projet, nous avons étudié les changements provoqués, au niveau des films de Ch-X, après 1 cycle de stérilisation par oxyde d'éthylène et gas

plasma Sterrad[®]-100S. Les propriétés mécaniques, capacités de gonflage, angle de contact statique et la topographie de surface sont évalués.

Les études de biocompatibilité ont montré que les particules de Ch-X n'ont pas provoqué d'effets cytotoxiques, de même que leurs produits de dégradation. La viabilité cellulaire était équivalente à celles des contrôles, excepté pour la concentration de 5 et 10 mg/ml. Cet effet est plus attribué à la pression exercée par le poids des particules qu'à un effet cytotoxique.

L'incubation des macrophages avec les particules a conduit à la production de l'IL-1 β , avec un taux maximal pour la dose de 0.1 mg/ml. Les produits de dégradation, quant à eux, n'ont pas montré l'élévation du taux de la cytokine par rapport aux contrôles. La sécrétion du TNF- α et de l'oxyde nitreux est influencée de façon équivalente par les particules de Ch-X et leur produits de dégradation. Toutefois, une légère augmentation du taux de TNF- α est observée.

Les études *in vivo* ont montré que l'hydrogel semble être bien toléré par les tissus. Le processus de guérison est initié avec la présence de dépôts de collagène. La formation de la capsule fibreuse n'a pas augmenté en fonction de la dégradation du matériau. La résorption progressive de l'hydrogel a été mise en évidence par la fragmentation des particules ainsi que par la phagocytose par les macrophages. De plus, les analyses par

microscopie électronique à transmission n'ont pas montré de signes de dommages cellulaires (gonflement de mitochondries et présence de réticulum endoplasmique rugueux) après l'ingestion du Ch-X. Le large taux de fragments phagocytés n'a pas conduit à la mort des cellules, ni à la libération de leur matériel.

Les études de la biodégradation *in vitro* ont permis d'observer l'effet protecteur du xanthane contre la dégradation du chitosane dans les milieux gastrique et intestinal simulés. La dégradation du chitosane et du complexe a montré une relation proportionnelle au temps d'incubation et inversement proportionnelle au pH des solutions. Nous avons montré que le chitosane et le complexe se dégradent plus rapidement dans le milieu acide (FGS) conduisant à la formation GA dans la première étape et du N-Ac-GA dans la seconde. En plus, la complexation a conduit à un meilleur contrôle du taux de dégradation donnant à l'hydrogel un potentiel d'utilisation comme véhicule médicamenteux à libération contrôlée.

La troisième partie de notre projet concerne les effets de la stérilisation sur les films de Ch-X. Les capacités de gonflage ainsi que les propriétés mécaniques ont montré une diminution après traitement par Sterrad[®] (plasma + H₂O₂). Par contre, les mesures de l'angle de contact ont permis d'observer une augmentation après stérilisation par oxyde d'éthylène. Les analyses par microscopie électronique à balayage ont montré des changements de surface des films après traitement par oxyde d'éthylène alors que la stérilisation par Sterrad[®] n'a pas provoqué de changements. Ce qui suggère que les

changements de propriétés de surface sont induits par l'oxyde d'éthylène alors que Sterrad[®] a un effet plus en profondeur.

En conclusion, le Ch-X a montré une bonne biocompatibilité et se dégrade plus lentement que le chitosane. Il pourrait donc constituer un bon candidat comme système de libération contrôlée de médicaments. Par ailleurs, la méthode de stérilisation doit être choisie avec grande attention dépendamment des propriétés et caractéristiques escomptées.

Abstract

Hydrogels display an interesting properties by their network structure allowing a high level water retention without the dissolution of the polymer itself which makes them suitable for controlled drug delivery system. They represent the advantage of clearance from the body after administrance as a result of their degradation, without need of their removal. Among them, we studied the chitosan-xanthan (Ch-X) polyelectrolyte complex based on chitosan and xanthan hydrogels. These polyionic polysaccharides having opposite charges allow ionic interaction and then, complexation.

Several studies reported on the use of chitosan and xanthan in the biomedical field as a biocompatible polymers. However, since no work have been reported on the biological properties of the complex, we investigated its biocompatibility, biodegradation and the effects of sterilization on its physico-chemical properties.

The biocompatibility studies were performed by using *in vitro* and *in vivo* models. The former aimed to assess the cytotoxic effects of the hydrogel particles and extract products on fibroblastic cell line L-929 by using MTT test. As well, macrophages cell line J-774 were used to determine the inflammatory reactions by the measurement of cytokines such as TNF- α and IL-1 β . Nitric oxide (NO) production was also assessed in the supernatant as a marker of the macrophages activation.

In vivo studies were performed after Ch-X particles subcutaneous implantation at the dorsal level of Wistar male rats. The animals were sacrificed and histological analyses were used to evaluate cellular and tissular reactions to the material and its degradation after 1-12 weeks.

The second step of our work consisted on the biodegradation behavior of Ch-X microspheres in simulated media constituted of gastric and intestinal fluids (SGF and SIF). PBS was used as a control which displayed a neutral pH and contained no enzymes. Samples were collected throughout the dissolution process at various time intervals. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis were performed after 1, 3, 5, 7, 15, 21 and 30 days. The biodegradation rate was reported by the measurement of glucosamine (GA) and N-Acetyl-glucosamine (N-Ac-GA) peaks area allowing us to quantify the degradation kinetics in the media used. In parallel, a comparative study was made between chitosan and the complex.

During the third part of this project we studied the changes occurred in Ch-X films after 1 cycle ethylene oxide (EtO) and Sterrad[®]-100S gas-plasma sterilization. The mechanical properties, swelling capacities, water static contact angle and surface topography analyses were carried out.

Based on biocompatibility studies, Ch-X particles, showed no cytotoxic effects, neither their degradation products. The cells viability was equivalent to the controls except for

the particles used at the concentrations of 5 and 10 mg/ml. This effect is attributed to the compression exerted by the particles weight rather than a cytotoxic effect.

Macrophages incubation with the particles showed a production of IL-1 β with a maximal level for the dose of 0.1 mg/ml whereas the extract products did not show this enhancement. TNF- α and NO secretion were influenced in the same way by Ch-X extract products with a slight sensitivity for TNF- α secretion.

According to *in vivo* studies, Ch-X hydrogel seemed to be well tolerated by the tissues. The healing process was initiated as shown by collagen deposition, and the fibrous capsule formation did not increase as the degradation of the complex was taking place. The hydrogel progressive resorption was evidenced by the particles fragmentation as well as their phagocytosis by macrophages. Furthermore, TEM studies showed no signs of cells damage, i.e. swollen mitochondria and rough endoplasmic reticulum, after Ch-X ingestion. The large amount of phagocytosed Ch-X fragments did not lead to cell death, neither to release of cell material.

In vitro biodegradation studies allowed us to observe that Ch-X provided a protective effect against Ch degradation in both simulated gastric and intestinal fluids. The degradation of Ch and the complex were found to be dependant on the time incubation and the pH of the media. We have shown that both Ch and the complex degraded faster in acidic pH (SGF) leading to GA formation in the first step and to N-Ac-GA in the second one. Also, the complexation led to a better control of the degradation rate giving an

additional controlled release characteristics to the complex when used as drug carrier system.

The third part of our project deals with the sterilization process effects on Ch-X films. The swelling capacities as well as the mechanical properties decreased after Sterrad[®] (plasma + H₂O₂) treatment, whereas the contact angle measurement increased slightly after EtO sterilization. SEM analyses showed changes in film surfaces after EtO treatment, whereas no difference was observed for Sterrad[®] treated specimens. This could suggest that surface properties changes were induced by EtO and Sterrad[®] provoked more effects on the films' bulk properties.

In conclusion, Ch-X displayed a good biocompatible properties and degraded slower than Ch. This could make it a good candidate as a drug delivery system. Sterilization method ought to be cautiously chosen depending on the device expected properties.

Table des matières

Remerciements	v
Résumé.....	vii
Abstract	xii
Table des matières.....	xvi
Liste des tableaux.....	xxi
Liste des figures	xxii
Liste des sigles et abréviations	xxvi
 Chapitre 1. Introduction.....	 1
 Chapitre 2. État des connaissances.....	 7
2.1 Chitine/chitosane	7
2.1.1 Propriétés biologiques.....	12
2.1.2 Le chitosane dans le domaine biomédical	14
2.1.3 Biodégradation	18
2.2 Le xanthane	19
2.2.1 Le xanthane dans le domaine biomedical	22

2.2.2 Stabilité et dégradation	23
2.3 Complexes polymériques	24
2.3.1 Facteurs influençant la complexation	25
2.3.2 Complexes à base de chitosane (exemples)	25
2.3.3 Chitosane-xanthane.....	29
2.3.3.1 Facteurs influençant la complexation	30
2.3.3.2 Utilisation du complexe dans le domaine biomédical	33
Chapitre 3. Matériel et méthodes.....	34
3.1 Étude de la biocompatibilité	34
3.1.1 Matériel	35
3.1.1.1 Étude <i>in vitro</i>	35
3.1.1.2 Étude <i>in vivo</i>	37
3.1.2 Expérimentation	38
3.1.2.1 In vitro.....	38
3.1.2.2 In vivo	44
3.2 Étude de la biodégradation.....	48
3.2.1 Matériel.....	48
3.2.1.1 Échantillons.....	48
3.2.1.2 Milieux physiologiques.....	48
3.2.1.3 Appareillage	50

3.2.2 Manipulations et Analyses.....	51
3.2.2.1 Manipulations	51
3.2.2.2 Mesure de la biodégradation.....	52
3.3 Étude des effets de la stérilisation sur les propriétés physico-	53
3.3.1 Matériel	53
3.3.1.1 Échantillons.....	53
3.3.1.2 Stérilisateurs.....	54
3.3.2 Expérimentation et analyse	55
3.3.2.1 Propriétés de gonflage.....	55
3.3.2.2 Analyse de l'énergie de surface	55
3.3.2.3 Propriétés mécaniques	57
3.3.2.4 Analyses mécaniques dynamiques.....	58
3.3.2.5 Analyse de la topographie.....	58
 Chapitre 4. Résultats des études de la biocompatibilité in vitro et in vivo	59
4.1 Abstract	63
4.2 Introduction	64
4.3 Materials and methods.....	68
4.3.1 In vitro studies.....	68
4.3.2 In vivo studies	72

4.4	Results.....	74
4.4.1	In vitro cytotoxicity studies	74
4.4.2	In vivo biocompatibility study.....	80
4.5	Discussion	86
4.6	Conclusion	90
4.7	References.....	91
 Chapitre 5. Résultats des études de la biodégradation.....		96
5.1	Abstract	99
5.2	Introduction	100
5.3	Materials.....	104
5.4	Methods	106
5.5	Results.....	107
5.6	Discussion	115
5.7	Conclusion	118
5.8	References.....	119
 Chapitre 6. Résultats de l'étude de la stérilisation (non publiés)		124
6.1	Propriétés de gonflage	129

6.2 Énergie de surface	130
6.3 Propriétés mécaniques	133
6.4 DMTA.....	136
6.5 Topographie	140
 <i>Chapitre 7. Discussion générale et conclusions.....</i>	<i>142</i>
7.1 Étude de la biocompatibilité	143
7.2 Étude de la biodégradation.....	147
7.3 Étude des effets de la stérilisation	151
7.4 Perspectives	154
 <i>Références.....</i>	<i>156</i>

Liste des tableaux

Tableau 2.1 Applications biomédicales de la chitine et ses dérivés (Hon. 1995).....	14
Tableau 2.2 Influence du degré d'acétylation du chitosane sur la composition de l'hydrogel (Dumitriu et al., 1994);	31
Tableau 2.3 Influence du poids moléculaire sur les capacités de gonflage de l'hydrogel	32
Tableau 2.4 Influence du pH de la solution de chitosane sur la complexation avec le xanthane (Dumitriu et al., 1994).	32
Tableau 3.1 Nombre de rats utilisés pour l'étude <i>in vivo</i> et périodes d'implantation	45

Liste des figures

Figure 2.1 Unités substituées dans certain dérivés de la chitine (à partir de Muzzarelli, 1998).....	10
Figure 2.2 Unités substituées de certains dérivés du chitosane (à partir de Muzzarelli, 1998).....	11
Figure 2.3 Unité pentasaccharidique répétitive du xanthane.	20
Figure 2.4 Représentation du complexe chitosane-xanthane	30
Figure 3.1 Pastilles de chitosane-xanthane pour implantation chez le rat.....	37
Figure 3.2 Modèle animal (rat Wistar mâle) utilisé pour l'implantation des pastilles de Ch-X	38
Figure 3.3 Rasage de l'animal et désinfection locale avant implantation de la Pastille.	44
Figure 3.4 Implantation de la pastille de Ch-X en sous-cutané. (a): Ouverture de la poche sous-cutanée; (b) : introduction de la pastille	45
Figure 3.5 Prélèvement des échantillons à la fin de la période d'implantation.....	46
Figure 3. 6 Spectre typique montrant le pic de glucosamine	52
Figure 3.7 Film de chitosane-xanthane	53
Figure 3.8 Gouttelette d'eau déposée sur la surface du film chitosane-xanthane pour la mesure de l'angle de contact.	56
Figure 4.1 Schematic representation of Chitosan and Xanthan interaction to form the CH-X hydrogel.....	67
Figure 4.2 Effects of CH-X particles on L-929 cell viability particles (direct contact).	75

Figure 4.3 Effects of CH-X extract products on L-929 viability	75
Figure 4.5 Effects of CH-X extracts on TNF- α secretion.....	77
Figure 4.6 Effects of CH-X particles on IL-1 β secretion.....	77
Figure 4.7 Effects of CH-X extract products on IL-1 β secretion.....	78
Figure 4.8 Effects of CH-X particles on NO secretion by J-774 macrophages	79
Figure 4.9 Effects of CH-X extract products on NO secretion by J-774 macrophages .	79
Figure 4.10 LM micrograph (Original magnification x 625) of acute inflammatory reaction developed against peripheral CH-X particles (P) after 1 week implantation in rat subcutaneous tissue.....	81
Figure 4.11 LM micrograph (original magnification x 156) showing dense fibrosis formation with blood vessels (arrows) and inflammatory reaction around CH-X particles (P) after 2 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.....	81
Figure 4.12 LM micrograph (original magnification x 390) showing CH-X particles (P) individualization, invasion by the host cells and fragmentation (F) after 4 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.....	82
Figure 4.13a LM micrograph (Original magnification x 156) showing more CH-X particles fragmentation and degradation and fibrous tissue (FT) pre-organization after 8 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.....	82
Figure 4.13b LM micrograph (Original magnification x 625) showing CH-X particles (P) encapsulation by fibrous connective tissue (FT) and ingestion by phagocytosing cells (head arrows) after 8 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.....	83

Figure 4.14	LM micrograph (Original magnification x 156) showing a well organized fibrous tissue (FT) with a decrease in its thickness after 12 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.	83
Figure 4.15	TEM micrograph (original magnification x 8300) showing CH-X particle (P) engoing biodegradation. Fragments of the hydrogel (White arrows) are shown internalized by macrophages (Black arrow) after 4 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.	84
Figure 4.16	TEM micrograph (original magnification x 8300) showing fibroblast adhering along CH-X particles (P) after 8 weeks of implantation in rat subcutaneous tissue.	85
Figure 4.17	TEM micrograph (original magnification x 8300) showing CH-X particle (P) surrounded by macrophages highly packed with the material fragments (F) after 12 weeks of implantation in rat subcutaneous tissue.	86
Figure 5.1	Schematic representation of Chitosan and Xanthan interaction to form the CH-X hydrogel.	101
Figure 5.2	GA production by CH and CH-X as a function of degradation time.	108
Figure 5.3	HPLC chromatograph of CH and CH-X after 7 days degradation in SGF.	109
Figure 5.4	NAc-GA production by CH and CH-X as a function of degradation time.	110
Figure 5.5	HPLC chromatograph of CH and CH-X after 7 days degradation in SIF ..	110
Figure 5.6	CH HPLC chromatograph after 7 days degradation in different media	111
Figure 5.7	CH and CH-X microspheres cumulative degradation products.	112
Figure 5.8	CH-X particles after 7 days incubation in PBS	113

Figure 5.9 CH-X particles after 15 days incubation in SGF	113
Figure 5.10 CH-X particles after 1 day incubation in SGF	114
Figure 5.11 CH-X particles after 7 days incubation in SGF.	114
Figure 5.12 CH-X particles after 15 days incubation in SIF	115
Figure 6.1 Influence de la stérilisation sur les capacités de gonflage de films de chitosane-xanthane (n = 10).	130
Figure 6.2 Influence des techniques de stérilisation sur l'angle de contact	131
Figure 6.3 Angles de contact sur les films de Ch-X (a : contrôle; b : stérilisé par Sterrad [®] ; c : stérilisé par oxyde d'éthylène).	132
Figure 6.4 Effet de la stérilisation sur le déplacement ultime	134
Figure 6.5 Effet des méthodes de stérilisation sur la rigidité	134
Figure 6.6 Effet des techniques de stérilisation sur la charge ultime.	135
Figure 6.7 Influence de la stérilisation sur le module dynamique E' du Ch-X à 100°C 136	
Figure 6.8 Influence de la stérilisation sur le module de perte E'' du Ch-X à 100°C..	137
Figure 6.9 Courbes montrant la relaxation des films Ch-X non stérilisés	138
Figure 6.10 Courbes montrant la relaxation des films Ch-X stérilisés par Sterrad [®]	138
Figure 6.11 Courbes montrant la relaxation des films Ch-X stérilisés par oxyde d'éthylène.	139
Figure 6.12 Effets de la stérilisation sur la topographie des films de Ch-X	140

Liste des sigles et abréviations

AAMI: Association for the Advancement of Medical Instrumentation

ADN : acide desoxy-ribonucléique

Ch : Chitosane

Ch-X : chitosane –xanthane

cm : centimètre

DA : degré d'acétylation

DMEM : Dulbecco's modified essential medium

DMTA : dynamic mechanical thermal analyses

EtO : Ethylene oxide

FGS : fluide gastrique simulé

FIS : fluide intestinal simulé

g : gramme

GA: glucosamine

HCl : acide chlorhydrique

HPLC : High performance liquid chromatography

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IL-1 β : Interleukin 1 beta

KV : Kilo volt

M : molaire

MEB : Microscopie electronique à balayage

mg : milligrammes

ml : millilitre

mm : millimètre

MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide

N-Ac-GA: N-Acetyl-glucosamine

NaOH : Hydroxyde de sodium

nm : nanomètre

NO : nitric oxide

°C : degré Celsius

OsO₄: tetroxyde d'osmium

PBS : phosphate buffered saline

pg : picogramme

SGF : simulated gastric fluid

SIF : simulated gastric fluid

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

X : Xanthane

μ g : microgramme

μ m: micromètre

Chapitre 1. Introduction

Les polymères biodégradables représentent des outils de choix dans l'usage biomédical. Leur utilisation est requise là où l'application nécessite leur résorption, après accomplissement de leur « tâche ». Plusieurs applications ont été développées pour ce type de polymères dans la chirurgie reconstructive, le cardio-vasculaire, les systèmes de libération de médicaments, l'ophtalmologie, etc.

En tant que véhicules médicamenteux, les hydrogels font partie de cette catégorie de polymères et sont dotés de propriétés physico-chimiques permettant d'incorporer ou de lier des substances actives. Ce lien conduit généralement à la formation d'une structure capable de protéger l'agent d'intérêt des conditions et environnement hostiles du vivant. De plus, ils permettent d'être utilisés d'une façon ciblée. C'est à dire qu'ils sont capables de se dégrader dans un environnement précis, là où la libération de la drogue est requise dépendamment de leur structure et propriétés.

Parmi les hydrogels biodégradables, le chitosane, un polysaccharide versatile, a fait l'objet de plusieurs études pour ses potentiels d'utilisation en biomédical de même que le xanthane, plus utilisé dans le domaine alimentaire et exploré comme système de libération de drogues. Leur origine naturelle, disponibilité, coût et biocompatibilité suscitent l'intérêt de plusieurs chercheurs pour des applications pharmaceutiques.

En vue de développer un nouveau matériau à partir du chitosane et du xanthane avec des propriétés améliorées, une complexation est effectuée entre les deux, donnant naissance à un hydrogel polyionique insoluble, mais biodégradable, le chitosane-xanthane Ch-X ou (chitoxanTM), avec des caractéristiques variables selon les conditions de préparation.

Des travaux effectués par Dumitriu et al. (1994) ont largement porté sur la caractérisation de l'hydrogel. Cependant le manque de données sur les propriétés du complexe, du point de vue biologique a conduit à la réalisation du projet actuel dans le but d'explorer son potentiel d'action dans le domaine biomédical et son utilisation comme véhicule pour des substances actives, à des buts thérapeutiques.

Cette utilisation nécessite :

- L'évaluation de la réponse tissulaire et cellulaire qui détermine sa biocompatibilité. En une phrase, ce mot est défini par Williams (1987) comme étant la capacité d'un matériau à induire une réponse favorable de l'hôte lors d'une application spécifique;
- La compréhension du phénomène de biodégradation et donc de ses caractéristiques physico-chimiques;
- La détermination du processus de stérilisation adéquat pour préserver les caractéristiques désirées et qui soit sans effets nocifs sur l'organisme hôte.

Nous avons donc procédé à la détermination de la biocompatibilité, *in vitro*, en évaluant la cytotoxicité sur des cellules fibroblastiques, à court terme. La présence de cette réaction implique la cause d'effets toxiques au niveau des cellules qui se traduisent par la mort cellulaire, l'altération de la perméabilité cellulaire, l'inhibition enzymatique (Hanson et al., 1996). Nous nous sommes limités à l'étude de la viabilité des cellules après traitement par des particules de l'hydrogel sur une période de 5 jours. Pour évaluer les effets de l'hydrogel à plus long terme, nous avons procédé à l'extraction des produits de dégradation dans du milieu de culture, sur une période de 4 semaines. Ces produits sont ensuite utilisés pour traiter les cellules et déterminer leur viabilité.

De la même façon nous avons traité une lignée de macrophages J-774 pour étudier leur activation par le complexe. L'intérêt des expériences sur ce type de cellules réside dans le rôle qu'elles jouent dans la réponse induite à la suite de l'implantation d'un matériau dans l'organisme. Les macrophages, après la chirurgie, vont libérer des médiateurs cellulaires qui vont stimuler les autres types cellulaires. Ceux-ci vont, à la suite des signaux, entrer en phase de reconstruction du tissu endommagé. Il est à noter que le phénomène est, certes, plus complexe et loin d'être à sens unique. Mais nous prenons comme point de départ le macrophage car il est le premier à être recruté au site lésionnel.

Parmi les agents libérés, les cytokines et l'oxyde nitreux sont des indicateurs de la réponse inflammatoire et connus pour induire la prolifération des lymphocytes T, la synthèse de protéines et des facteurs additionnels qui, au retour, augmentent l'activation

des macrophages (Barkley et al., 1989; Bonfield et al., 1989; Colton et al., 1989; Miller et Anderson, 1988). Nous avons donc utilisé les macrophages et dosé le taux de production des cytokines IL-1 β et TNF- α ainsi que l'oxyde nitreux pour évaluer l'effet stimulateur du complexe.

Les tests *in vitro* sont réalisés sans avoir recours à l'utilisation d'animaux. Ils ont pour but de minimiser l'utilisation des animaux et l'avantage de donner des réponses rapides après des analyses à des coûts moindres par rapport à l'étude *in vivo*. Ces tests sont cependant incapables d'évaluer d'une façon claire l'interaction du matériau avec l'environnement complexe du vivant.

Après les résultats obtenus lors de la phase *in vitro*, montrant des effets non cytotoxiques, nous avons procédé à l'implantation de l'hydrogel dans un modèle animal pour compléter l'étude de la biocompatibilité. Nous avons utilisé le rat Wistar mâle pour mesurer la réaction cellulaire et tissulaire après introduction de pastilles de chitosane-xanthane en sous-cutané au niveau dorsal. Après des périodes d'implantation de 1, 2, 4, 8 et 12 semaines, des analyses histologiques sont effectuées par microscopie optique et électronique. La première nous a permis de voir les structures tissulaires et cellulaires à différents temps et la deuxième nous a renseigné sur l'état des cellules et leur action vis-à-vis du complexe.

Après la biocompatibilité, un deuxième volet consacré à la cinétique de dégradation du complexe est exploré. Des milieux physiologiques simulés, stomacal et intestinal sont utilisés pour cette étude. Elle est conduite simultanément avec celle du chitosane, connu pour son potentiel en tant que système de libération contrôlée de médicaments. Cette manipulation vise à évaluer l'intérêt de l'utilisation du complexe par rapport au chitosane seul et d'identifier son apport par rapport à un polymère déjà connu.

Le troisième volet fait suite au souci de trouver une méthode de stérilisation adéquate pour un matériau à base de polysaccharides. Ceux-ci sont connus pour leur sensibilité aux traitements thermiques excluant ainsi les méthodes de stérilisation par chaleur sèche et autoclave (Leo et al., 1990). Ceci est, de plus, confirmé par des expériences que nous avons effectuées en stérilisant les films de chitosane-xanthane par la chaleur sèche et à l'autoclave. Les résultats ont montré que ceux-ci deviennent bruns dans le premier cas et jaune opaque dans le deuxième. Ce qui constitue un indice des altérations des propriétés des films. Ces derniers sont friables et quasiment impossible à manipuler suite à la carbonisation. De même, en nous basant sur des données de la littérature, la stérilisation par irradiation fût éliminée car susceptible de provoquer des changements majeurs dans les propriétés physico-chimiques (Sintzel et al., 1997). Ceci nous a conduit à évaluer les effets de la stérilisation par plasma et oxyde d'éthylène comme techniques alternatives.

En utilisant les deux méthodes nous avons examiné les effets engendrés au niveau des propriétés de gonflage, tension de surface, mécaniques, thermodynamiques et topographiques.

Étant-donné le manque de littérature sur l'hydrogel utilisé tout au long du travail de maîtrise, nous avons exploré les études effectuées sur chacun de ces composants : le chitosane et le xanthane. Un aperçu des utilisations potentielles et des propriétés des polymères figure dans le chapitre 2, ainsi que quelques exemples sur les complexes à base du chitosane. Le chapitre 3 décrit les techniques utilisées pour la détermination de la biocompatibilité, biodégradation des particules et l'influence de la stérilisation sur les films du complexe.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'articles pour la biocompatibilité (chapitre 4) et la biodégradation (chapitre 5). Les résultats de la stérilisation sont présentés dans le chapitre 6 et feront l'objet d'une publication dans le prochain futur. Les discussion et conclusions des différents résultats, de même que les perspectives figurent dans le chapitre 7.

À ce stade de l'étude, et à la lumière des résultats obtenus, nous avons des raisons de croire que le champs reste ouvert pour des explorations et des études poussées sur les hydrogels à base de chitosane-xanthane. Ainsi, divers complexes avec des caractéristiques contrôlées et des utilisations déterminées pourront voir le jour.

Chapitre 2. État des connaissances

L'hydrogel étudié le long du projet de maîtrise est constitué de deux polymères : le chitosane et le xanthane. Contrairement au complexe Ch-X, chacun des deux polymères a fait l'objet de plusieurs études. Dans cette partie, nous abordons les caractéristiques et utilisations de chacun pour finir avec les travaux réalisés jusqu'à ce jour sur le Ch-X.

2.1 Chitine/chitosane

Le chitosane est obtenu après déacétylation de la chitine. Celle-ci est un copolymère de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose et 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose. Elle diffère des autres polysaccharides par la présence d'azote en plus du carbone, hydrogène et oxygène dans la chaîne macromoléculaire (Muzzarelli, 1985).

La chitine est obtenue à partir de carapaces de crabes, crevettes, langoustines et homards. Son isolation passe par deux étapes : la déminéralisation par l'acide chlorhydrique et la déprotéinisation par la soude en solution. Les lipides et les pigments peuvent aussi être extraits. Ces opérations sont souvent empiriques et varient avec le degré de minéralisation des carapaces, les saisons, et les conditions de température (Muzzarelli, 1998). Pour être à l'abri de ces conditions incontrôlables, du chitosane de sources fongiques peut être obtenu. Parmi celles qui sont étudiées, on peut citer les suivantes:

- *Absidia blakesleeana* et *coerulea* (Davoust et Hansson, 1992).
- *Mucor rouxii* (Arcidiacono et Kaplan, 1992).
- *Gongronella butleri*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Rhizopus delemar* et *oryzae* (Hang, 1990).
- *Choanephora cucurbitarum*, *Mortierella isabelina* et *Mycosphaerella pinodes* (Matsubara et Kuroda, 1991; Miyoshi et al. 1992).

Le chitosane est présent dans les cellules et peut être extrait par l'acide acétique ou des agents alcalins. L'extraction alcaline est préférable dans le cas où une dissolution ultérieure est requise. Le poids moléculaire est de l'ordre de 500 kDa et le degré d'acétylation autour de 0.10 (Rane et Hoover, 1993).

Les propriétés saillantes de la chitine, qui gèrent son comportement général et reliées aux méthodes d'isolation, sont les suivantes (Muzzarelli, 1998) :

- En tant que polyacétal, elle est facilement hydrolysée par les acides.
- Elle est stable dans des milieux alcalins dilués mais elle est facilement oxydée à l'air dans des concentrés alcalins chauds.
- Elle est sensible à des températures aussi peu élevées que 50°C et peut être dénaturée s'il elle est chauffée de façon prolongée.
- C'est un agent chélateur pour des ions métalliques de transition.

- Si la chitine est précipitée avec des solvants inappropriés, elle donne naissance à la formation d'hydrates, alcoolates, et kétonates.
- Des composés N-chlorés sont formés avec des chlorines d'où l'utilisation préférentielle de peroxides.
- Des groupements amines sont présents dans toutes les sortes de chitine commune.
- La chitine est un polymère chiral et hélicoïdal.
- À l'état sec, elle est dégradée par de nombreux microorganismes qui produisent des enzymes chitinolytiques ou d'autres enzymes d'activité non spécifique pour la chitine.
- Elle est promptement dégradée par des enzymes de crustacées et doit être isolée le plutôt possible.
- Elle est dépolymérisée par la sonication ou le traitement microondes.
- C'est un polymère filmogène ainsi que la plupart de ses dérivés et peut être mélangé avec d'autres polymères tel que le poly(vinyle alcool).
- Sous forme d'amines primaires la chitine devient très réactive.

Certains dérivés sont illustrés dans la figure 2.1. Les dérivés du chitosane sont illustrés dans la figure 2.2.

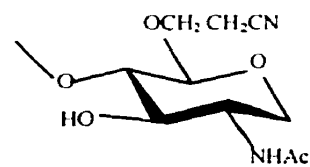
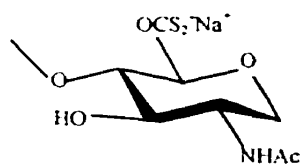
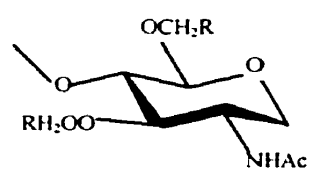
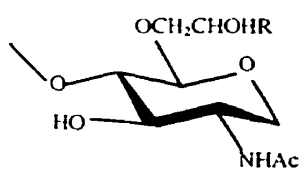
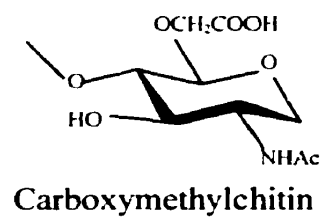
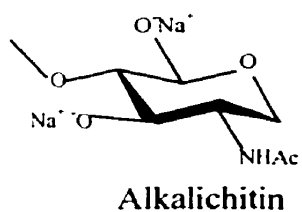


Figure 2.1 Unités substituées dans certain dérivés de la chitine (à partir de Muzzarelli, 1998).

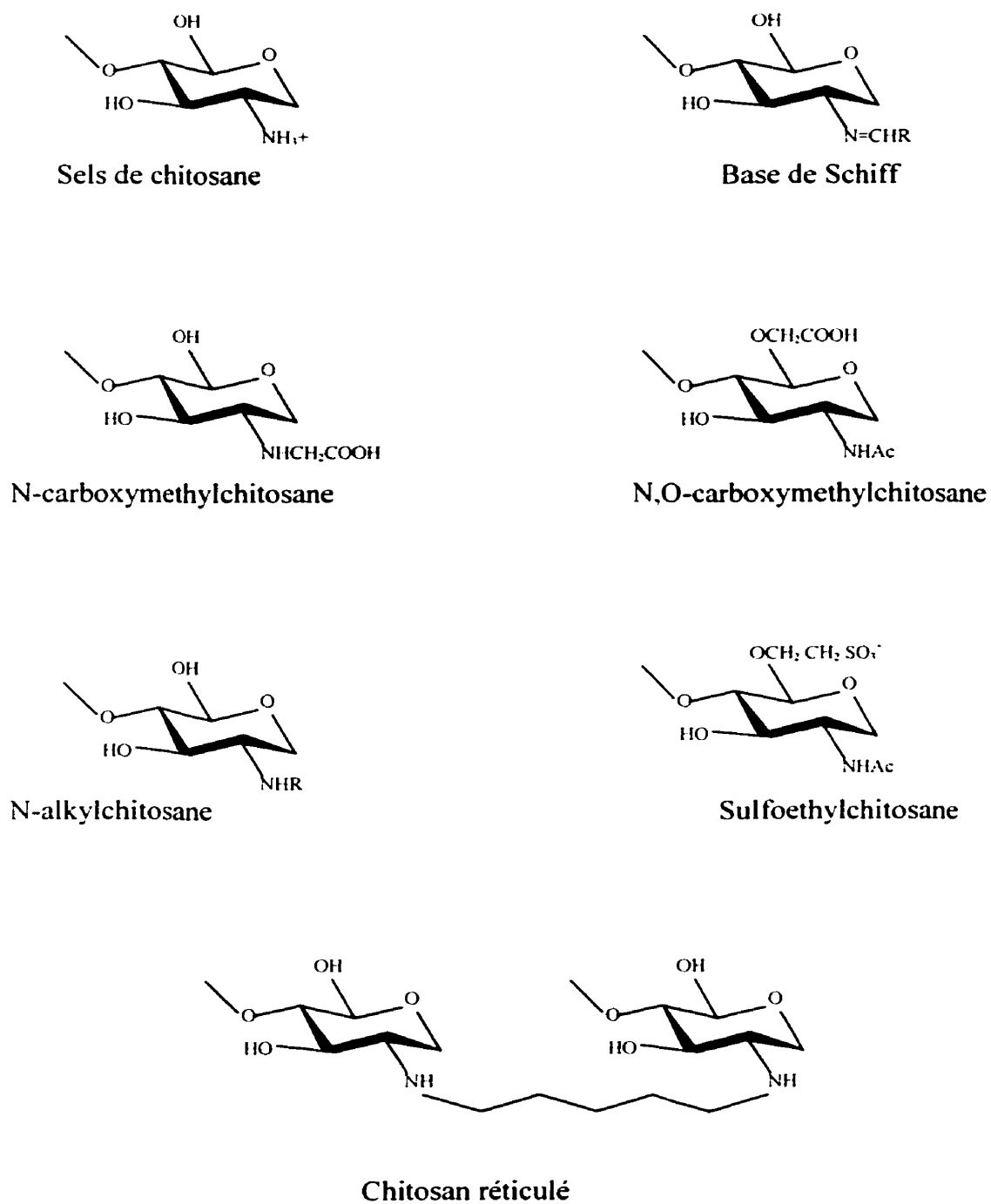


Figure 2.2 Unités substituées de certains dérivés du chitosane (à partir de Muzzarelli, 1998).

Le chitosane a fait l'objet de plusieurs études et a retenu l'attention en tant que candidat pour plusieurs applications médicales. Il a été évalué comme accélérateur de guérison de plaies, membranes de dialyse, fibres de sutures, agent stabilisant de liposomes, antimicrobien, antiviral, antitumoral, réducteur de cholestérol au niveau sanguin, agent hémostatique, stimulant du système immunitaire et en tant que système de relargage de médicaments.

La liste d'utilisation et d'études est longue. Dans ce mémoire nous nous contenterons de citer quelques exemples pertinents sur l'usage et les propriétés du chitosane.

2.1.1 Propriétés biologiques

Plusieurs études sont rapportées, dans la littérature, sur l'usage du chitosane seul ou lié à d'autres polymères synthétiques ou biologiques. Sa biocompatibilité a fait l'objet de plusieurs investigations. Par exemple, des membranes formées par le mélange de polyvinyl alcool (PVA) et de chitosane ont montré une meilleure adhésion et croissance de fibroblastes comparativement aux membranes de PVA pur (Chuang et al., 1999).

Faisant partie des polymères cationiques, le chitosane permettrait la complexation de l'ADN et a le potentiel d'être utilisé en tant que vecteur non viral pour délivrer des gènes. Cette complexation empêche la dégradation de l'ADN par les Dnases qui sont des enzymes impliquées dans la dégradation de l'ADN (Richardson et al., 1999). De plus, ce

dernier a démontré que le chitosane hautement purifié n'est ni toxique, ni hémolytique. Des fractions de bas poids moléculaire peuvent être administrées en intraveineuse sans engendrer d'accumulation au niveau du foie, ce qui suggère une utilisation en tant que composants pour la libération de gènes.

Muzzarelli (1997), dans un modèle de reconstitution tissulaire, a montré que l'utilisation du chitosane active les macrophages et stimule les fibroblastes conduisant, ainsi, à la formation de tissus vascularisés et physiologiquement normaux. Des analyses histologiques après implantation chez le rat, au niveau musculaire, ont montré une bonne tolérance des particules de chitosane par les tissus environnants (Jameela et Jayakrishnan, 1995).

Peluso et al., 1994, ont soumis des macrophages à l'effet du chitosane qui a montré leur stimulation par la sécrétion d'oxyde nitreux.

De plus, le chitosane s'est révélé être biocompatible avec le cortex cérébral avec un potentiel hémostatique (Brandenberg et al., 1984).

Les résultats obtenus sur la biocompatibilité sembleraient être liés au degré d'acétylation du chitosane. Hidaka et al., (1999) ont montré que des membranes de chitosane avec un degré de d'acétylation de 35, 30 et 20 % augmentent l'ostéogénèse mais induisent une

réaction inflammatoire sévère. Par contre, un degré d'acétylation de 5% induit une réaction inflammatoire moindre et une ostéogénèse plus faible.

2.1.2 Le chitosane dans le domaine biomédical

Depuis le début des années 80, le chitosane n'a cessé de faire l'objet d'énormes investigations dans le domaine biomédical. Le tableau 2.1 résume les différentes applications et formes utilisées du polymère.

Forme physique	Applications
Solution	Agent bactériostatique Agent homéostatique Cosmétiques
Gel	Système de relargage Spermicide
Poudre	Poudre pour gants de chirurgie immobilisation d'enzymes
Membrane/film	Membrane de dialyse Lentilles de contact Réparation tissulaire
Éponge	Hémostatique des muqueuses Réparation tissulaire
Miscelles	Matériaux anticholéstérémiques Agents antigestifs Anticoagulants Compositions antisordres Agent antibilirubidémique

Tableau 2.1 Applications biomédicales de la chitine et ses dérivés (Hon. 1995)

Depuis les années 80, des centaines d'articles ont traité de l'utilisation du chitosane comme véhicule de médicaments (Miyazaki et al., 1981; Hou et al., 1985). Son effet antitumoral a été mis en évidence par Kyotani et al., (1992). Il a été étudié comme système de libération d'agents neurotrophiques, de protéines et d'ADN (acide desoxy-ribonucléique) (Mittal et al., 1994; Jameela et al., 1994; Alaxakis et al., 1995).

Pratiquement, tous les tissus ont été soumis à l'action du polymère et l'étude de ses effets. À des fins d'applications dans la chirurgie dentaire régénératrice, le chitosane a été utilisé en tant qu'agent liant pour l'hydroxyapatite dotée de capacités ostéoconductrices. En plus de sa biocompatibilité, le chitosane permet une bonne stabilisation des particules au site chirurgical et une bonne reconstitution osseuse (Pal et al., 1997).

Le chitosane potentialise la différenciation des cellules ostéoprogénitrices et facilite la formation osseuse *in vitro* (Klokkevold et al., 1996). L'induction de la formation osseuse est aussi observée *in vivo*. Elle semble être favorisée par l'attraction des facteurs de croissance grâce aux propriétés polycationiques du chitosane et leur capture par le gel (Muzzarelli et al., 1994; Muzzarelli et al., 1993b). Il constitue aussi un bon agent ostéoconducteur lors des chirurgies dentaires (Kawakami et al., 1992; Muzzarelli et al., 1993a).

Au niveau sanguin, le chitosane est utilisé comme agent anticoagulant et ne produit ni hémolyse ni altération des lymphocytes et érythrocytes (Muzzarelli et al., 1984).

Grâce à ses similarités structurales avec des glucosaminoglycannes qui sont des constituants de la matrice extracellulaire, le chitosane joue un rôle très important dans l'attachement, la différenciation et la morphogénèse des cellules.

Le chitosane préalablement mélangé avec du collagène, de la gélatine et de l'albumine, pour améliorer la biocompatibilité et la rugosité de surface, a été utilisé dans la construction de tissu hépatocytaire. Des hépatocytes de rats et de porcs ont été isolés et cultivés sur les membranes auxquelles elles ont montré un bon attachement notamment celles de porc fœtal qui ont survécu pour une période d'au moins 14 jours (Elcin et al., 1998).

Une étude similaire sur des cellules nerveuses cultivées sur des membranes de chitosane/collagène a montré un bon attachement et intégration à la matrice de l'hydrogel avec une survie de plus de 2 semaines *in vitro* et *in vivo* (Eser Elcin et al., 1998).

Le traitement de fibroblastes humains par du chitosane de source fongique a conduit à la prolifération des cellules. Des études cytomorphologiques, ont démontré le pouvoir attractant du chitosane qui peut constituer une matrice permettant l'ancrage et la croissance des fibroblastes impliqués dans la cascade de régénération tissulaire (Chung et al., 1994). Zielinski et Aebischer (1994) ont utilisé le chitosane pour l'encapsulation de différentes lignées cellulaires et ont montré leur attachement, croissance et viabilité.

D'autres expériences ont porté sur l'utilisation du chitosane en tant que support pour des cellules du système nerveux consistant à établir un pont au niveau des cellules de

Schwann et permettre leur élongation de même que l'extension des neurites (Wu et Zao, 1997; Dillon et al., 1998). Kuang et al.(1998), ont aussi montré que le chitosane favorise la croissance des cellules de Schwann.

La bioadhésion est aussi une propriété d'utilité non négligable dans l'utilisation du chitosane dans la libération d'agents thérapeutiques. Elle vise à augmenter le temps de résidence du système polymère/médicament et sa stabilité, par attachement du polymère à la surface ciblée et permettre ainsi une optimisation de l'assimilation médicamenteuse (Lehr, 1994). Cette propriété est conférée par le caractère polyionique. En fait, plus la densité de charge est importante, meilleure est l'adhésion du polymère (Peppas et Buri, 1985; Jiménez-Castellano et al., 1993), suggérant l'importance des interactions électrostatiques. Le chitosane est chargé positivement de part la présence de groupements amines libres à la suite de la déacétylation des résidus glucosamines. Au niveau muqueux, sa nature polycationique lui permet d'interagir avec la mucine (Fiebrig et al., 1994; 1995).

D'autres polysaccharides tels que l'alginate, négativement chargé et de haute densité de charge est connu pour être bioadhésif (Chickering et al., 1997; Craig et Tamburic, 1997; Gomotz et Wee, 1997). Cependant, son couplage avec le chitosane, améliore ce caractère dans le tract gastro-intestinal (Gaserod et al., 1998). Dans le cas des liposomes, leur temps résidence, à ce niveau, est augmenté après leur enrobage avec le chitosane (Takeushi et al. 1996).

Au niveau nasal, la propriété mucoadhésive est utilisée pour la libération de cytokines et d'antigènes par des microparticules de chitosane (Witschi et Mersny, 1999).

Cette propriété est hautement influencée par les caractères hydrophiliques et rhéologiques du chitosane. Ils jouent, notamment, un important rôle, pour son potentiel d'utilisation comme système bioadhésif au niveau périodontal et oral (Needleman et al., 1998). En effet, une étude comparative entre le chitosane et d'autres polymères a montré un temps de libération de la fluorescéine plus long pour celui-ci après adhérence à la poche périodontale (Needleman et al., 1997).

2.1.3 Biodégradation

En général, les polysaccharides sont dégradés par hydrolyse enzymatique. Le chitosane n'échappe pas à ce principe (Hirano et Yagi, 1980). Aucune dégradation appréciable n'est notée dans des milieux neutres sans enzymes et à température ambiante.

Le chitosane est dégradé par une enzyme spécifique, la chitosanase. L'action de l'enzyme conduit à la production abondante de glucosamine ce qui indique une coupure des liens glycosidiques β -1,4. Des hétéropolysaccharides sont aussi produits consistant en glucosamines et N-acetyl-D-glucosamine (Fukamizo, et al., 1994).

L'utilisation d'agent de réticulation tel que le glutaraldéhyde conduit à une baisse de la biodégradation du chitosane. *In vitro*, le chitosane a montré une libération de 25% seulement de mitoxantrone incorporée après 36 jours. *In vivo*, pas de dégradation significative n'est observée après trois mois d'implantation dans le muscle de rats. Ceci étant dû au durcissement du polymère par la réticulation. (Jameela et Jayakrishnan, 1995).

L'un des moyens qui permettent de contrôler la biodégradation est de varier le degré de substitution. Hirano et al., (1989) ont montré que les dérivés partiellement N-acétylés du chitosane sont plus susceptibles à la digestion par les lysozymes.

2.2 Le xanthane

Le xanthane fait partie d'une large famille de polysaccharides d'origine microbienne. Il est synthétisé par *Xanthomonas campestris* et composé d'unités oligosaccharidiques répétitives. Il contient une chaîne centrale cellulosique avec une chaîne latérale trisaccharidique fixée sur chaque second résidu glucosidique (Jansson et al., 1975; Melton et al., 1976) (figure 2.3). On peut observer les groupements acide pyruvique diketal en position 4,6 du mannose terminal alors que le groupement *O*-acétyl est fixé à la position 6 du mannose interne. Certains échantillons de xanthane contiennent plus d'un groupement acétyle par unité répétitive. Dans ce cas, un second groupement *O*-acétyle se trouve en position 6 du mannose terminal (Stankowski et al., 1993).

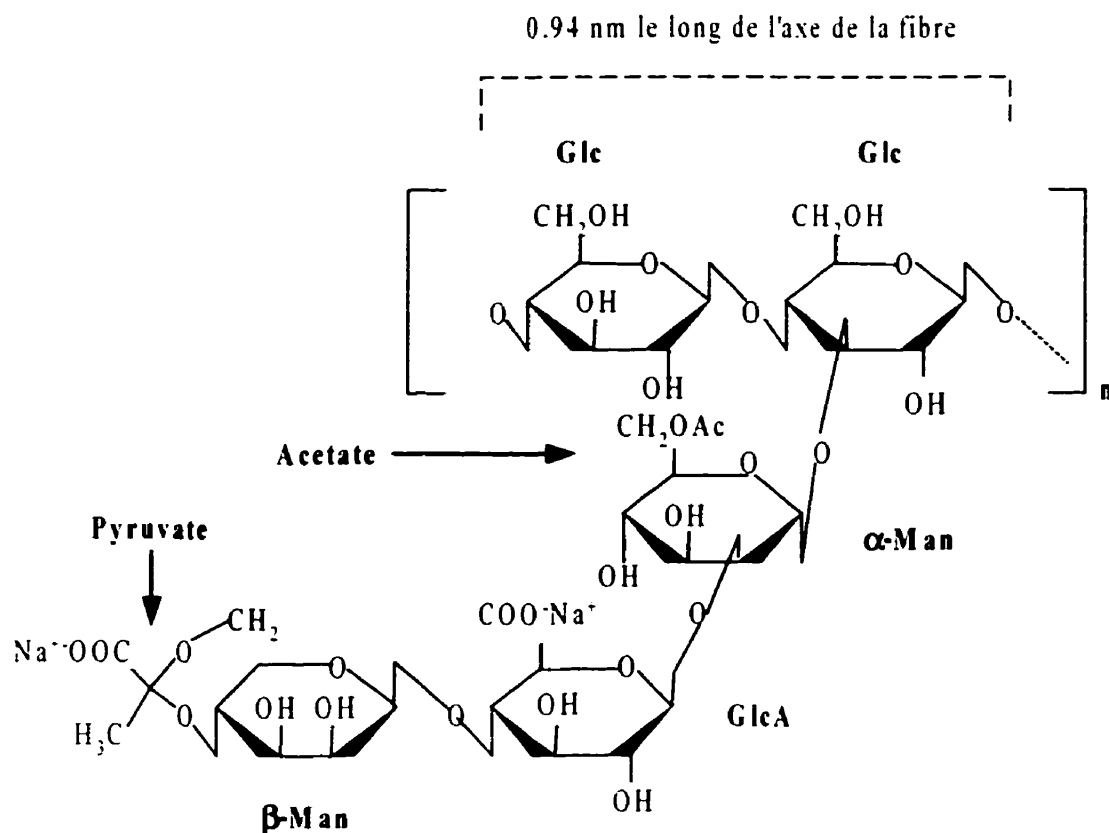


Figure 2.3 Unité pentasaccharidique répétitive du xanthane.

Les chaînes latérales peuvent être tronquées pour donner des variantes structurales du xanthane par manipulation au niveau des gènes impliqués dans le transfert des résidus de sucre. En cultivant différentes souches de *Xanthomonas campestris*, une variété de xanthanes, avec des pourcentages différents de groupements acétyle et pyruvique, est obtenue (Shatwell et al., 1990). Ces derniers sont portés sur les chaînes latérales avec des taux variables donnant naissance à des xanthanes avec des propriétés viscosimétriques différentes. En fait, le pyruvate augmente la viscosité alors que

l'acétate la diminue. De plus, des manipulations visant à éliminer les résidus de sucre des chaînes latérales influence cette propriété. Le manque du mannose terminal engendre un xanthane avec de pauvres propriétés viscosimétriques contrairement au manque du mannose terminal et de l'acide glucuronique (en même temps) qui les augmente. Il semblerait alors que l'acétylation a un effet négatif sur la viscosité du tetramère mais non sur le trimère (Hassler et Doherty, 1990). Les groupements acétyle empêchent la « coagulation » de la solution de xanthane et sont importants lors des interactions avec d'autres polymères.

En présence de sel, il se produit une réduction de répulsion mutuelle des segments du polymère (Tempio et Zatz, 1981). C'est l'un des facteurs capables d'affecter la viscosité. Elle dépend, cependant de la concentration du polymère dans la solution. Zatz et al., (1984) ont montré qu'à 0.3% elle n'est pas affectée par le sel alors qu'elle augmente quand la concentration du polymère s'élève. À moins de 0.3%, elle diminue.

D'autres variantes du polymère peuvent être obtenues par hydrolyse acide partielle. En éliminant rapidement le pyruvate et l'acétate, le β -D-mannose est préférentiellement enlevé, suivi d'une hydrolyse lente du α -D-mannose. (Christensen et al., 1991; Christensen et al., 1993). Les enzymes β -D-mannosidases et β -D-glucuronidases, peuvent être utilisées pour contrôler la suppression de sucres individuels des chaînes latérales (Tait et Sutherland, 1989).

2.2.1 Le xanthane dans le domaine biomedical

L'hydrophilicité du xanthane permet la formation d'un gel visqueux en présence de l'eau. Cette propriété a mené à considérer son application dans le domaine biomédical. Des exemples d'applications courantes ou potentielles couvrent son utilité en tant qu'excipient sous forme de tablettes. Tout comme les autres hydrocoloïdes, il peut s'éroder ou se dissoudre lentement dans les fluides pour une libération progressive et prolongée de substances actives. La libération contrôlée de médicaments est l'utilisation qui a fait l'objet de plus d'études concernant le potentiel du xanthane dans le domaine biomédical (Talukdar et al., 1998). Kondo et al. (1996) et Uekama et al. (1995) ont montré qu'il améliore la « biodisponibilité » des médicaments tout en diminuant leur concentration dans le sang.

Des formulations à base du xanthane ont été désignées pour prolonger le temps de rétention d'agents antimicrobiens, facilement dégradés par l'action protéolytique des enzymes salivaires (Ruissen et al., 1999). Il a aussi été conçu comme agent stabilisant de certaines formulations thérapeutiques (Chollet et al., 1999).

Il est généralement admis que la libération de médicaments à partir de matrices hydrophiliques telles que le xanthane est gouvernée par les processus suivants (Talukdar et Kinget, 1997) :

- Le gonflage de la matrice qui aboutit à la formation d'un gel.
- La dissolution de la substance active dans le gel.
- La diffusion de la substance active en dehors de la matrice.
- L'érosion de surface et/ou la dissolution de la matrice.

Pour évaluer la cinétique de libération d'indométacine à partir d'une formulation orale de tablettes de xanthane, Talukdar et al., (1998) ont étudié le gonflage et l'érosion de la matrice ainsi que la libération de la drogue dans du tampon phosphate. Ils ont montré que le profil de la cinétique de libération du médicament est influencée par le contenu en polymère dans la préparation. Elle est inversement proportionnelle au contenu en polymère. Dans un milieu de force ionique équivalente à celle du tract gastro-intestinal, la concentration saline induit une diminution de relargage de la drogue ainsi que le gonflage de la matrice. Ce qui a pour effet de diminuer le processus érosionnel qui est le mécanisme par lequel l'indométacine est libérée.

2.2.2 Stabilité et dégradation

Le xanthane est capable de maintenir son poids moléculaire pour de longues périodes lorsqu'il est soumis à des conditions dépolymérisantes (acides et radicaux libres) (Christensen et al., 1996). La chaîne cellulosique peut être dépolymérisée par les cellulases (β -1,4-endoglucanases) quand le xanthane est de conformation désordonnée (Sutherland, 1984 et Ahlgren, 1993).

La suppression partielle des chaînes latérales par hydrolyse acide rend le xanthane plus susceptible à la dégradation par les cellulases (Christensen et Smidsrød, 1996). Ce genre de modification ouvre un champs d'investigation sur les possibilités d'utilisation d'un xanthane avec des degrés de biodégradation prédéterminés.

2.3 Complexes polymériques

Plusieurs complexes peuvent être obtenus par réaction de deux ou plusieurs polymères. Leurs propriétés macromoléculaires dépendent des polymères utilisés, ayant leur composition et caractéristiques déterminées, de même que des conditions de préparation. Les liaisons entre les différents polymères peuvent se produire via des interactions intermoléculaires telles que :

- Les forces de Coulomb (ioniques)
- Les forces de liaison hydrogène
- Les forces de transfert de charge
- Les forces de van der Waals

Ces interactions donnent naissance à différents types de complexes, respectivement :

- Les complexes polyélectrolytes

- Les complexes à liaisons hydrogène
- Les complexes à transfert de charge
- Les stéréocomplexes

(Tsuchida et Abe, 1982).

2.3.1 Facteurs influençant la complexation

De part sa nature cationique, le chitosane forme des complexes polyélectrolytes. Une variété d'entre eux peut être obtenue en changeant la structure chimique des composants polymériques en variant le poids moléculaire, la flexibilité, la structure des groupements fonctionnels, la densité de charge, l'hydrophilicité, l'hydrophobicité et la stéréorégularité. La complexation est aussi influencée par les conditions de la réaction telles que le pH, la force ionique, la concentration des polymères et leur ratio ainsi que la température, conduisant ainsi à une diversité des propriétés physiques et chimiques des complexes (Kubota et Kikuchi, 1998).

2.3.2 Complexes à base de chitosane (exemples)

En explorant la littérature, il ne fait aucun doute que le complexe à base de chitosane, le plus étudié, est celui du chitosane avec l'alginate. Plusieurs applications potentielles ont émergé de plusieurs recherches.

La complexation entre les deux polymères semble se produire par interaction des anions carboxyliques de l'alginate et les groupements aminiques du chitosane (Matsumoto, 1993).

Des microparticules de chitosane-alginate sont obtenues par réaction des deux polymères en présence de chlorure de calcium. La complexation dépend de plusieurs variables incluant le temps de réaction, le poids moléculaire du chitosane, la concentration de l'alginate, la concentration du chitosane, et le pH. Par exemple, un temps de réaction de 10 à 45 minutes n'a pas d'effet sur le relargage à long terme d'albumine. En augmentant la concentration d'alginate, la libération de la protéine diminue alors qu'elle augmente en diminuant le poids moléculaire du chitosane par oxydation nitrique. Cette augmentation est aussi constatée en passant d'un pH 3.0 à 8.0 (Polk et al., 1994).

Des éponges formées par le chitosane et l'alginate de sodium ont été étudiées dans la réparation tissulaire. Ce modèle a été appliqué avec des agents antibactériens pour protéger les lésions en supprimant la prolifération des microorganismes et l'invasion des plaies (Kim et al., 1999). L'utilisation de microparticules du complexe réduit l'érosion et prolonge l'action des microsphères à pH 7-7.5. La libération médicamenteuse est réalisée par diffusion à partir des matrices gonflées et la relaxation du polymère à pH 1.2-4.5 (Takka et Acarturk, 1999).

D'autres polymères tels que, le poly(vinyle alcool), carboxymethylcellulose, hyaluronate ont été aussi utilisés pour former des complexes avec le chitosane.

Des microsphères de chitosane-poly(vinyle alcool), sont obtenues par la méthode de coacervation saline. Le traitement alcalin s'est avéré efficace dans la formation de macro-complexes stables (Stolberg et al., 1999). Le complexe a été étudié pour la libération de médicaments, l'attachement des cellules et leur croissance de même que pour l'immobilisation enzymatique.

La conséquence de la complexation des deux polymères conduit à une meilleure absorption des médicaments au niveau intestinal. En effet, un test *in vivo*, de transit gastro-intestinal a montré une prolongation de celui-ci pour les sphères du complexe. La nature de la couche muqueuse au niveau de l'intestin doit jouer un rôle important dans la rétention du complexe, vu que son traitement avec des agents mucolytique réduit le temps de transit (Sugimoto et al., 1998).

Des membranes du complexe se sont avérées plus favorables pour l'adhérence et la croissance cellulaire comparativement aux membranes de poly(vinyle alcool) pur. Elles semblent, spatialement, médier la réponse, l'attachement et la croissance cellulaire (Chuang et al., 1999). Dans des hydrogels avec plus de 15% de chitosane, les cellules attachées sont, non seulement viables mais aussi, capables de proliférer. Cette capacité est proportionnelle à la quantité du chitosane dans le complexe. À 40% l'attachement et la prolifération cellulaire sur l'hydrogel excèdent ceux observés sur des substrats de collagène (Koyano et al., 1998).

L'immobilisation de l'enzyme uréase dans des capsules du complexe a montré le maintien de la protéine dans sa forme active (Miguez et al., 1997).

La complexation du chitosane avec le carboxyméthylcellulose a permis d'obtenir des tablettes, après compression, pour la libération prolongée de drogue insoluble. Le dosage de chacun des polymères permet de contrôler le relargage du médicament ainsi que la quantité de la drogue dans la préparation (Inouye et al., 1987).

Le chitosane complexé avec le hyaluronate a montré une action protectrice du chitosane contre les enzymes hydrolytiques spécifiques des glycosaminoglycannes. De même, l'adhérence et la prolifération des cellules sur les supports du complexe a permis la confirmation du matériau comme agent potentiel pour la régénération et réparation tissulaire (Denuziere et al., 1998).

Sous forme de tablettes bioadhésives, la drogue incorporée voit sa libération affectée par le taux des deux polymères utilisés pour la fabrication du matériau. Cet effet pourrait être dû à l'interaction des deux polymères à la suite de la pénétration de l'eau (Takayama et al., 1990).

Le chitosane est aussi connu pour interagir avec des matériaux biologiques tels que l'héparine et le collagène et donner des complexes d'un grand intérêt dans les applications médicales.

L'interaction ionique de l'héparine et du chitosane conduit à la formation d'un complexe utilisé pour la re-épithélialisation au niveau de plaies de la peau. L'héparine, utilisée seule s'est avérée n'avoir aucun effet alors que le complexe a permis la stimulation des cellules et leur croissance et ainsi, la re-épithélialisation de 9/10^{èmes} de la plaie. D'où l'hypothèse que les facteurs de croissance qui se lient à l'héparine se trouvent stabilisés par le complexe (Kratz et al., 1997).

Dépendamment des conditions utilisées, le collagène forme des complexes avec le chitosane, soit par interactions purement électrostatiques ou par liaisons hydrogène. Dans le premier cas, le taux de complexation du chitosane est relativement bas (maximum de 10 %) et l'effet protecteur du collagène par le chitosane contre la digestion par la collagénase n'est pas mise en évidence de façon certaine. Dans le deuxième cas, le chitosane provoque une forte protection contre les enzymes spécifiques (Taravel et Domard, 1996).

2.3.3 Chitosane-xanthane

La formation du complexe chitosane-xanthane obéit aux mêmes conditions que lors de la formation des autres complexes à base de chitosane. Ce sont deux polyelectrolytes de charges opposées. Lorsque le chitosane (polybasique) et le xanthane (polyacide) interagissent, il se forme alors un complexe insoluble (figure 2.4).

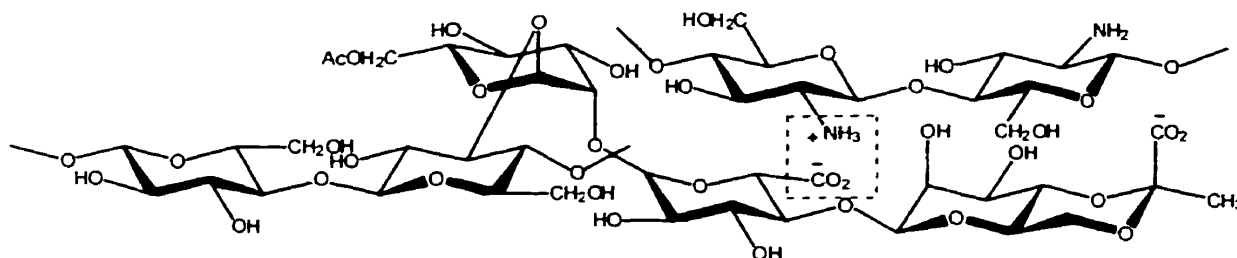


Figure 2.4 Représentation du complexe chitosane-xanthane

La complexation fait suite à la liaison des groupements amines du chitosane avec ceux carboxyliques du xanthane selon la réaction ci-dessous :



2.3.3.1 Facteurs influençant la complexation

Les caractéristiques physico-chimiques du chitosane jouent un rôle majeur dans les propriétés du complexe et sa formation (Dumitriu et al., 1994). Des paramètres tels que le degré d'acétylation (tableau 2.2), le poids moléculaire (tableau 2.3) et le pH (tableau 2.4) influencent les propriétés de gonflage et le taux de complexation.

Les complexes formés à partir du chitosane avec des degrés d'acétylation de 10% et 28% gonflent avec un même profil alors qu'avec 34%, ils montrent une baisse de cette propriété. Ceci peut trouver une explication dans le fait que quand le degré d'acétylation

est bas, plus de liaisons ioniques se produisent. Il en résulte un gel plus dense avec une capacité accrue d'absorption d'eau.

Une augmentation du degré d'acétylation signifie moins de groupements amines libres.

Ceci a comme conséquence la diminution du taux de chitosane dans le complexe.

DA du chitosane (%)	Ratio Ch/X g/g	<u>Composition de l'hydrogel</u>				
		Chitosane (%)	Xanthane (%)	pH	α_{\max} (%)	W (%)
10	0.540	40.1	59.9	3.6	900	90.2
10	0.540	40.1	59.9	5.0	490	80.4
10	0.540	40.1	59.9	8.0	250	72.3
28	0.555	24.9	75.1	3.6	800	87.1
28	0.555	24.9	75.1	5.0	560	85.2
28	0.555	24.9	75.1	8.0	260	73.9
34	0.592	24.3	75.7	3.6	680	88.4
34	0.592	24.3	75.7	5.0	240	70.3
34	0.592	24.3	75.7	8.0	176	65.2

Tableau 2.2 Influence du degré d'acétylation du chitosane sur la composition de l'hydrogel (Dumitriu et al., 1994);

DA : degré d'acétylation; Ch/X : ratio du chitosane sur le xanthane; α_{\max} : degré maximal de gonflage; W : contenu en eau

Par ailleurs, l'augmentation du poids moléculaire du chitosane conduit à la formation d'hydrogel avec des propriétés de gonflage diminuées.

Poids moléculaire	Degré d'acétylation (%)	Taux de complexation (%)	α_{\max} (%)
691.930	28.0	98.9	560
452.875	27.9	97.2	805
191.325	28.2	84.5	992
122.350	28.8	81.3	1050

Tableau 2.3 Influence du poids moléculaire sur les capacités de gonflage de l'hydrogel

(Dumitriu et al., 1994); α_{\max} : degré maximal de gonflage

Le taux de complexation des deux polymères dépend du pH de la solution du chitosane. Il décroît avec la baisse du pH à cause de la protonation des groupements amines qui empêche la réaction avec les groupements carboxyliques du xanthane (tableau 2.4).

pH	Complexation du xanthane (%)
1.5	21
2.5	36
3.5	56
4.5	60
5.5	78
6.3	98

Tableau 2.4 Influence du pH de la solution de chitosane sur la complexation avec le xanthane (Dumitriu et al., 1994).

2.3.3.2 Utilisation du complexe dans le domaine biomédical

Les propriétés de gonflage traduites par le changement de volume en réponse aux conditions environnantes font du complexe un candidat de choix pour la libération contrôlée de médicaments. Cependant, la nouveauté de l'hydrogel chitosane-xanthane fait que très peu d'études sont disponibles sur son utilisation. La majorité des travaux ont porté sur sa caractérisation par le groupe de Dumitriu et ses collaborateurs.

Ce dernier a étudié de plus l'immobilisation et la libération d'enzymes de même que les effets du complexe sur leur activité (1996). L'encapsulation de la lipase et xylanase dans des sphères du complexe a conduit à la stabilisation thermique et à l'augmentation de l'activité des enzymes.

L'encapsulation des micro-organismes *Corynebacterium glutamicum* dans l'hydrogel a été reportée par Chu et al. (1996). Ils ont montré que l'activité de la fumarase était 5 fois plus élevée que dans les cellules non immobilisées.

Comme nous l'avons cité dans le chapitre 1, nous traitons, dans ce mémoire, de la biocompatibilité, biodégradation et effets de la stérilisation sur le complexe Ch-X. Le chapitre suivant expose les démarches expérimentales conçues et réalisées pour atteindre notre objectif.

Chapitre 3. Matériel et méthodes

Le projet effectué traite de 3 paramètres : la biocompatibilité, biodégradation et effets de la stérilisation sur l'hydrogel à base de chitosane et xanthane. Ce chapitre est donc constitué de 3 parties exposant les matériels et méthodes utilisés pour chaque étude.

3.1 Étude de la biocompatibilité

Cette étude comprend deux parties.

La première décrit les études effectuées sur des cellules provenant de lignées établies pour déterminer la biocompatibilité *in vitro*. Pour cela, des essais sont réalisés sur des fibroblastes pour déterminer l'effet des particules de chitosane-xanthane sur la croissance et la viabilité cellulaire alors que les essais sur les macrophages servent à déterminer la réaction inflammatoire vis-à-vis de l'hydrogel.

La deuxième partie expose les démarches effectuées pour mesurer l'effet de pastilles fabriquées à partir de l'hydrogel après implantation dans un modèle animal, le rat. Ceci dans le but de déterminer la biocompatibilité *in vivo*.

3.1.1 Matériel

3.1.1.1 Étude *in vitro*

Échantillons

Ils sont composés de particules de chitosane-xanthane sèches (voir point 3.1.2.1). stérilisées à l'oxyde d'éthylène et laissées s'aérer afin d'éliminer tout risque de cytotoxicité due à l'agent stérilisant.

Lignées cellulaires

La lignée fibroblastique L-929 (ATCC, CCL1 NCTC clone 929) est utilisée pour le test de détermination de la cytotoxicité des particules.

La lignée de macrophage J-774 (ATCC) est utilisée pour les études de détermination de la réaction inflammatoire.

Milieux de culture

Le milieu utilisé pour la culture des macrophages est le RPMI 1640 (Gibco Laboratories, No.1007688) avec, comme suppléments, les ingrédients ci-dessous:

- 2mM de L-glutamine

- 2.3 g/L de bicarbonate de sodium.
- 10% de sérum de veau fœtal désactivé par la chaleur (Gibco Laboratories, No. 1000415)
- Une solution de penicilline-streptomycine (100 unités/ml-100 µg/ml) (Gibco Laboratories, No. 1006400).

Pour la culture des fibroblastes le DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (Sigma) est utilisé. Il contient les mêmes suppléments que le RPMI. exception faite pour la L. Glutamine.

Réactifs

- MTT ou, 3-(4,5 dimethylthiazole-2yl)-2,5 triphenyl tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co., (St Louis, MO, USA).

C'est un colorant jaune utilisé pour déterminer la viabilité des cellules fibroblastiques.

- Kits pour dosages de cytokines (Biosource Int. Camarillo, CA. USA).

Ils servent à mesurer la quantité de TNF- α et IL-1 β dans les surnageants des macrophages après traitement des cellules par l'hydrogel.

- Réactif de Griess : sert à doser la quantité de nitrite dans les surnageants des macrophages stimulés. Il est composé de: 1% sulphanilamine; 0.1% naphthylene diamine dehydrochloride; 2.5% d'acide orthophosphorique.

3.1.1.2 Étude in vivo

Échantillons

Des pastilles de 1 cm de diamètre et 1 mm d'épaisseur sont obtenues après compression des particules avec une presse hydraulique (Carver Model C, Summit, N.J). 100 mg de particules de Ch-X sont utilisés pour fabriquer une pastille (figure 3.1).



Figure 3.1 Pastilles de chitosane-xanthane pour implantation chez le rat.

Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar mâles (Charles-River, St-Constant, Qc., Canada) (figure 3.2) ayant un poids de 200-250 g.

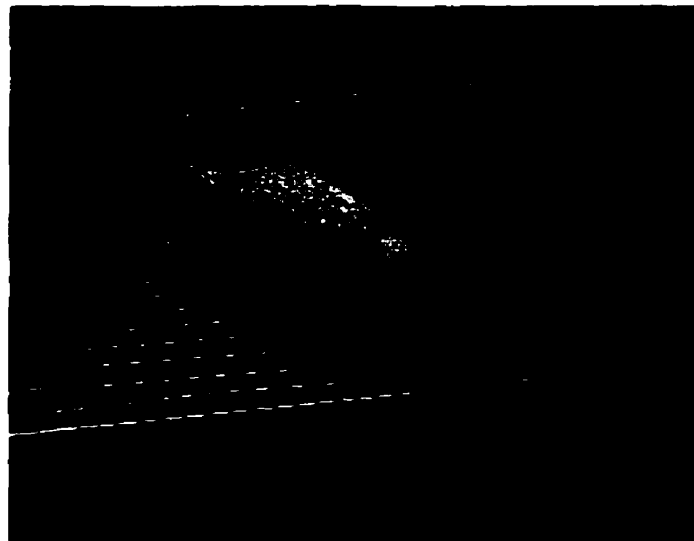


Figure 3.2 Modèle animal (rat Wistar mâle) utilisé pour l'implantation des pastilles de Ch-X

3.1.2 Expérimentation

3.1.2.1 In vitro

Fabrication des particules

La fabrication des particules est effectuée selon la méthode développée au laboratoire de génie chimique de l'université de Sherbrooke par le professeur Dumitriu.

- Préparation de la solution du chitosane

Le chitosane utilisé pour la préparation de la solution est de poids moléculaire de 150 000 Daltons, avec un degré d'acétylation de 12% est obtenu de Kemestrie Inc. (Sherbrooke, Canada).

Pour la préparation de 1 litre de solution, la procédure se déroule selon plusieurs étapes, comme suit :

- Suspension de 6.5 g de chitosane dans 300 ml de HCl 1 M;
 - Rajout de 200 ml d'eau distillée après 1 heure sous agitation;
 - Maintien sous agitation avec un léger chauffage (30-40°C) pendant 1 heure;
 - Rajout, progressif d'eau distillée jusqu'à obtention d'une solution claire pour un volume total de 900 ml;
 - Mesure du pH et neutralisation de la solution avec de la soude (NaOH) jusqu'à pH 5.7;
 - Ajustement du volume avec de l'eau distillée pour avoir un litre de solution.
- Préparation de la solution du xanthane

6.5 g de xanthane (Nutrasweet-Kelco, San Diego, CA, USA) sont dissouts dans 1 litre d'eau distillée sous agitation.

- Préparation des particules

Sous pression, la solution du xanthane est rajoutée à celle du chitosane (sous agitation) à travers une aiguille. Les proportions utilisées sont 150 ml de la deuxième pour 110 ml de la première. Lorsque les particules sont formées, les procédures suivantes sont réalisées :

- Décantation des particules pendant 2 heures;
- Lavage (3 fois) avec du tampon acétate (6.8 ml d'acide acétique glacial, 23.09 g d'acétate de sodium pour 1 litre d'eau);
- Lavage avec de l'eau distillée, plusieurs fois avec centrifugation entre les lavages.
- Séchage des particules dans un lyophilisateur.

Étude de la cytotoxicité : culture de fibroblastes

Cette étude est réalisée en utilisant les particules soit en contact direct avec les cellules, soit en mettant leur produits de dégradation après extraction dans des milieux de culture.

Ces études sont réalisées en nous basant sur les tests standards AAMI, 1996 (Association for the advancement of Medical Instrumentation).

Les tests ci-après sont réalisés 3 fois (3 expériences différentes) et chaque mesure est effectuée en triplicata.

- Contact direct

Les cellules L-929 sont cultivées dans des plaques de 96 puits à une densité de 1×10^4 par puits. Après confluence dans du DMEM, dans une atmosphère humide à 95%-5% O₂-CO₂, le milieu est aspiré et remplacé par du milieu frais contenant différentes concentrations des particules de Ch-X (0-10 mg/ml). La viabilité des cellules est déterminée chaque jour, pendant 5 jours, en utilisant le test MTT.

- Contact avec les produits de dégradation

10 mg/ml de particules de Ch-X sont dégradées dans un milieu de culture complet pour de périodes de 1 à 28 jours. Pour simuler les conditions physiologiques, les solutions sont soumises à une agitation permanente à 240 rpm dans une chambre maintenue à une température constante de 37°C. À différentes périodes d'extraction (1, 7, 14 et 28 jours), les surnageants sont récupérés et congelés à -20°C jusqu'à la fin de la période de 28 jours et le déroulement des tests. Des dilutions sont alors effectuées pour chaque extrait avec un ratio de 1/100; 1/20; 1/10; 1/2 et 1/1 dans du milieu de culture.

Après confluence, les cellules sont traitées avec chaque concentration d'extrait pour une période de 24 heures et la viabilité des cellules déterminée par le test MTT.

Test MTT

Le test MTT est effectué selon Mosmann (1983). 50 µl de la solution à 1mg/ml dans du milieu de culture frais sont rajoutés à chaque puits et les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37°C. À la fin de cette période, de l'Isopropanol-HCl (0.1N) est rajouté à chaque puits pour dissoudre les cristaux bleus formés par métabolisme du MTT par les cellules. La densité optique est déterminée à 570 nm en utilisant le lecteur de plaques (Beckman, Fullerton, CA, USA).

Étude de la stimulation des macrophages

Les macrophages sont cultivés dans des plaques de 96 puits à une densité de 1×10^4 cellules par puits. Après 24 heures, elles sont traitées par les particules (0.1, 1, 10 mg/ml) et les extraits obtenus après leur dégradation.

Les surnageants sont récupérés après 24 heures et les différents dosages effectués.

Dosage de l'interleukine β et du TNF- α (tumor necrosis factor- α)

Le dosage des deux cytokines dans les surnageants des macrophages est effectué par la technique ELISA. Les méthodes de dosage sont réalisées en suivant les directives incluses dans les kits de dosage. La densité optique est déterminée après lecture à 450 nm par un spectrophotomètre (Beckman, Fullerton, CA, USA).

Les concentrations des 2 cytokines dans les milieux sont mesurées et exprimées en pg/ml en se basant sur la courbe standard réalisée. Les doses minimales détectables sont en dessous de 7 pg/ml pour l'IL-1 β et de 3 pg/ml pour le TNF- α .

Dosage de l'oxyde nitreux (NO)

La production de l'oxyde nitreux (NO) est déterminée en mesurant la quantité de nitrite(NO₂⁻), qui est un métabolite stable du premier, dans le surnageant des cultures de macrophages.

La concentration est déterminée en se basant sur la méthode de Ding et al. (1988). 50 μ l de surnageant sont prélevés de chaque puits de culture et incubés avec un volume égal de réactif de Griess. Pendant 10 minutes à température ambiante.

La quantité de nitrite est mesurée par spectrophotométrie à 543 nm en utilisant le lecteur de plaques (Beckman, Fullerton, CA, USA).

Des dilutions de nitrite de sodium ont servi de gamme étalon utilisée pour la création de la courbe standard. 50 μ l de milieu de culture ont servi de blanc durant la lecture des résultats.

3.1.2.2 In vivo

Traitement des animaux

Avant de procéder à l'expérimentation animale, le projet est soumis et agréé par le comité d'éthique de l'hôpital Sainte Justine.

Après réception, les animaux sont gardés sous observation pour une période de 4 jours d'adaptation avec accès illimité à la nourriture et à l'eau. Avant l'implantation des pastilles, les animaux sont injectés par de la kétamine (90 mg/Kg) et Xylazine (10 mg/Kg) en intrapéritonéale. Le dos des animaux est rasé et désinfecté par de la bétadine et de l'alcool isopropylique (figure 3.3).



Figure 3.3 Rasage de l'animal et désinfection locale avant implantation de la Pastille.

- Implantation des échantillons

Le nombre d'animaux et la durée d'implantation sont illustrés dans le tableau 3.1.

Période d'implantation (semaines)	Nombre d'animaux	Contrôles	Total
1	6	2	8
2	6	2	8
4	6	2	8
8	6	2	8
12	6	2	8

Tableau 3.1 Nombre de rats utilisés pour l'étude *in vivo* et périodes d'implantation

Une incision de 2 cm est effectuée au niveau dorsal pour implantation de la pastille (1 par animal) en sous-cutané (figure 3.4) l'ouverture est refermée par suture.

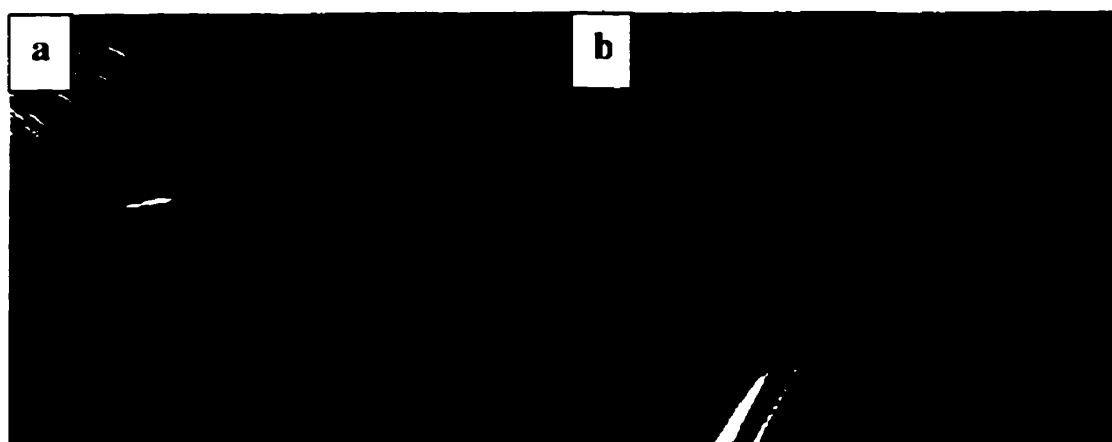


Figure 3.4 Implantation de la pastille de Ch-X en sous-cutané. (a): Ouverture de la poche sous-cutanée; (b) : introduction de la pastille

- Extraction et traitement des spécimens

À la fin de chaque période d'implantation, les animaux sont sacrifiés par surdose d'anesthésiant. Immédiatement après, les implants avec les tissus environnants sont excisés (Figure 3.5) et traités pour examens histologiques.

Les spécimens sont lavés dans du tampon salin (PBS) froid, coupés en deux et immédiatement fixés:

- dans la formaline pour des études histologiques en microscopie optique,
- dans la glutaraldéhyde pour des études histologiques en microscopie électronique

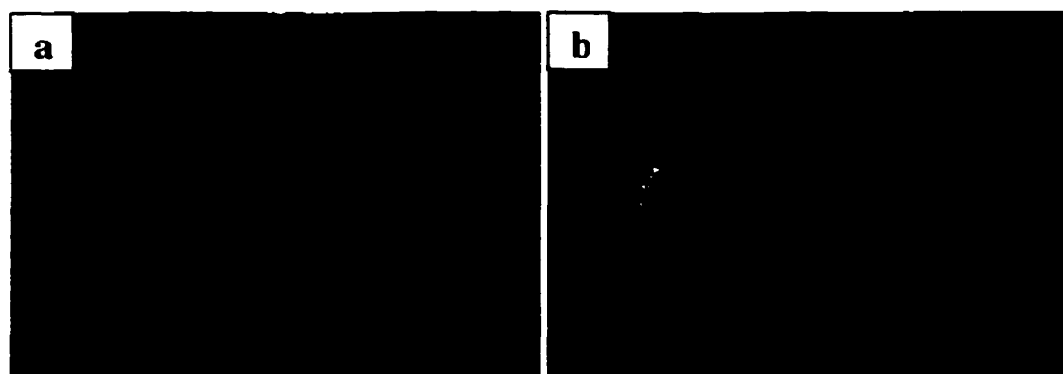


Figure 3.5 Prélèvement des échantillons à la fin de la période d'implantation

(a) : Prélèvement de la pastille; (b) : coupe de la pastille avec les tissus environnants.

- Traitement des spécimens pour analyses en microscopie optique

Les spécimens sont fixés, par immersion, dans une solution de formaline à 10 % et enrobés dans la paraffine. Des coupes de 5 μ m, dans le sens transversal sont effectuées

sur chaque échantillon. Elles sont étalées sur des lames et colorées par une technique classique d'Haematoxyline-Phloxine-Safran (HPS).

- Traitement des spécimens pour analyses en microscopie électronique

Une fixation primaire est effectuée par immersion des échantillons dans une solution contenant 2.5% de glutaraldehyde dans du tampon cacodylate 0.1 M, pH 7.4 pendant 2 heures à 4°C. Ensuite, les specimens sont post-fixés pendant 2 heures à 4°C dans une solution de 2% de tetroxyde d'osmium (OsO_4) dans du tampon cacodylate 0.1 M, pH 7.4.

La déshydratation des spécimens est alors effectuée en utilisant des concentrations croissantes d'éthanol (30 to 100%) et d'oxyde de polypropylène.

Les échantillons sont mis dans une solution Epon: oxyde de propylène (1:1) et enrobés dans l'Epon 812.

Des coupes ultrafines sont réalisées (60 nm) en utilisant l'appareil LKB ULTRATOME III. Les sections sont alors déposées sur des grilles de cuivre (200 mesh), et contre colorées avec du citrate de plomb et d'acétate d'uranyle.

Le microscope électronique (JOEL JEM 100CX) opérant à 60 kV est utilisé pour l'observation des coupes.

3.2 Étude de la biodégradation

3.2.1 Matériel

3.2.1.1 Échantillons

Des microsphères de chitosane-xanthane sont utilisées (voir préparation. point 3.1.2.1)

Le chitosane pur en particules est utilisé pour comparer la cinétique de dégradation du complexe.

3.2.1.2 Milieux physiologiques

Trois types de solutions sont utilisées pour évaluer la biodégradation des microsphères de chitosane-xanthane. Il s'agit de :

- PBS (phosphate buffer saline) qui est un tampon salin;
- FGS (fluide gastrique simulé), qui est un fluide gastrique simulé;
- SIF (fluide intestinal simulé) qui est un fluide intestinal simulé.

Ces deux derniers sont préparés selon USP XXII (1995).

Des antibiotiques (Pennicilline-streptomycine) et antimycotiques (Fungizone) de Gibco sont rajoutés à chaque solution dans des proportions de 1/100 pour éviter les

contaminations bactériennes. Cette précaution est prise pour éviter la dégradation des polymères par les microorganismes.

- PBS

La solution de PBS est préparée en dissolvant 9.6 g de "Dulbecco's phosphate buffered saline" (Sigma) dans un litre d'eau distillée déionisée.

- FGS

Le fluide gastrique simulé est préparé en dissolvant 2 g de chlorure de sodium et 3.2 g de pepsine (Sigma) dans 7 ml d'HCl. Le volume est ajusté avec de l'eau déionisée pour avoir un litre de solution. Le pH est ajusté à 1.2.

- FIS

Le fluide intestinal simulé est préparé par dissolution de 6.8 g de phosphate de potassium monobasique dans 250 ml d'eau distillée déionisée. La solution est maintenue sous agitation puis 190 ml de NaOH 0.2 N sont rajoutés. Ensuite 400 ml d'eau distillée déionisée sont rajoutés puis 10 g of pancréatine (Sigma).

Le pH est ajusté avec du NaOH 0.2 N à 7.5 \pm 0.1 et le volume ajusté à 1 litre avec de l'eau distillée déionisée.

3.2.1.3 Appareillage

Agitateur

L'agitateur est maintenu en permanence à 240 tour/minute dans une chambre à température constante (37°C).

HPLC

Les études par analyse en HPLC sont effectuées en utilisant l'appareil Waters (model 410, Millipore, Milford, MA, USA) doté de:

- Un détecteur d'absorbance (Waters, 486);
- Pompe à solvant (Waters, 510);
- Injecteur d'échantillons avec une boucle d'injection d'une capacité de 250 µl en acier inoxydable (U6K).

Colonnes

Une colonne LC-18 de 30 cm de long par 4.0 mm de diamètre interne (Supelcosil, Supelco, Bellefonte, PA) est utilisée en série avec une autre colonne RCM 8 x 10 Module (Waters, Milford, Massachusetts).

Standards de poids moléculaires

Les standards de poids moléculaire utilisés sont le glucosamine et le N-acetylglucosamine (Fluka).

3.2.2 Manipulations et Analyses

3.2.2.1 Manipulations

Les études de biodégradation sont effectuées en triplicata. 3 aliquots sont préparés pour chaque type de solution. 100 mg de particules de chitosane ou du complexe sont suspendues dans un tube de polyéthylène de 15 ml dans 5 ml de chaque solution. Pour chaque échantillon d'un même type de solution, les analyses sont effectuées 3 fois.

Les périodes de dégradation dans les milieux physiologiques (PBS, FGS, SIF) sont de 1, 7, 15 et 30 jours. À la fin de chaque temps, les solutions de dégradation sont filtrées en utilisant des filtres de Nylon ayant des pores de 45 microns. Ces derniers sont montés sur une seringue et changés avant chaque filtration.

La phase mobile utilisée durant l'analyse est composée d'eau ultrapure déionisée à température ambiante. Le flux est réglé à 0.7 ml/min.

3.2.2.2 Mesure de la biodégradation

Les standards de poids moléculaire sont dilués dans de l'eau (solution de 2 mg/ml) et injectés dans la boucle à raison de 100 μ l.

Le temps de rétention du glucosamine se situe à 6.33 minutes (figure 3.6) alors que le celui du N-acétylglucosamine se situe aux environs de 9 minutes.

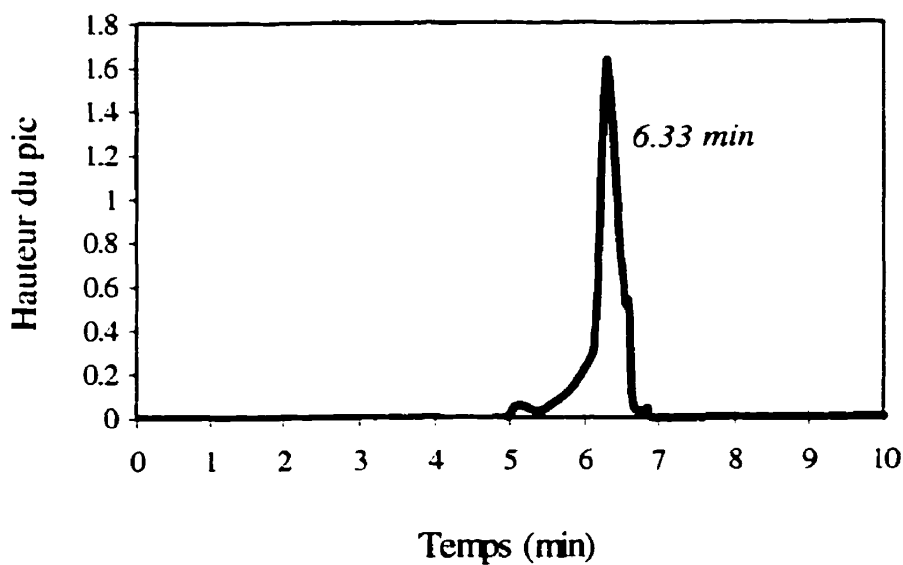


Figure 3. 6 Spectre typique montrant le pic de glucosamine

Les produits de dégradation sont quantifiés en calculant l'aire du pic en utilisant le logiciel « Millenium ».

Pour chaque échantillon, 3 injections sont effectuées.

3.3 Étude des effets de la stérilisation sur les propriétés physico-chimiques des films de chitosane-xanthane

3.3.1 Matériel

3.3.1.1 Échantillons

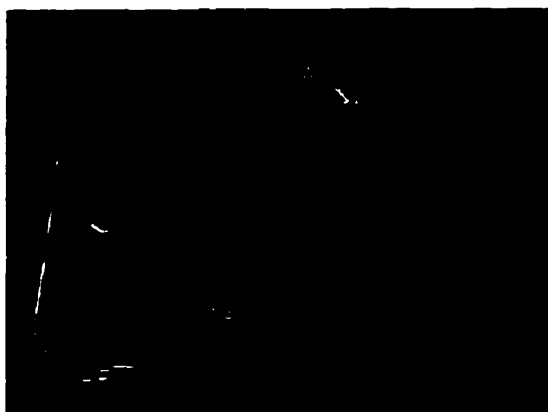


Figure 3.7 Film de chitosane-xanthane

Les films sont obtenus en laissant polymériser les 2 solutions (chitosane et xanthane) autour d'un ancrage fabriqué en découpant des filtres en papier (figure 3.7).

Après 4 jours à température ambiante, ils sont rincés avec de l'eau distillée.

Une autre étape de lavage est effectuée avec le tampon acétate (voir point 3.1.2.1) pendant 24 heures pour éliminer l'excès du chitosane.

Une autre période de lavage est effectuée dans de l'eau distillée pendant 24 heures avec plusieurs changements de bains.

Les films sont alors mis sous une hotte à flux laminaire pendant 24 heures pour le permettre de sécher.

Une fois secs, des bandes de 1 x 6 cm sont découpées et envoyées à la stérilisation.

3.3.1.2 Stérilisateurs

La stérilisation à base de plasma est effectuée avec le système Sterrad[®]-100S (ASP-Johnson & Johnson) qui combine une phase de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et une phase de plasma, en utilisant le stérilisateur disponible à l'hôpital Charles Lemoyne.

Pour la stérilisation par oxyde d'éthylène, le stérilisateur 3M Sterivac, de l'hôpital Sainte Justine est utilisé.

Pour les deux types de stérilisation, un seul cycle est utilisé et les conditions sont celles des milieux hospitaliers cités ci-dessus.

3.3.2 Expérimentation et analyse

3.3.2.1 Propriétés de gonflage

Pour mesurer les capacités de gonflage, les hydrogels témoins et traités sont pesés à l'état sec, identifiés et mis dans l'eau distillée, à température ambiante.

Après six heures, les hydrogels sont mis sur des filtres pour éliminer l'excès d'eau (Karadag et al., 1995) et pesés.

La capacité de gonflage est calculée en utilisant l'équation selon Güven et Sen (1991).

$$S\% = [(m_t - m_0)/m_0] \times 100.$$

Où :

S% = pourcentage de gonflage;

m_t = masse de l'hydrogel au temps t;

m_0 = masse de l'hydrogel sec au temps $t = 0$.

Une dizaine d'échantillons est utilisée pour chaque type de traitement et pour les échantillons non stérilisés.

3.3.2.2 Analyse de l'énergie de surface

La tension de surface est mesurée par la technique d'angle de contact statique en utilisant de l'eau distillée déionisée. Une goutte d'un microlitre du liquide est déposée, par un

système d'injection automatisé, sur la surface du film préalablement fixé sur une lame de verre.

Les analyses sont effectuées en utilisant le système VCA 2500 (Video Contact Angle). (Billerica, Ma).

Le logiciel du système permet de faire une acquisition d'image et la mesure des angles de contact (droit et gauche) eau-hydrogel (figure 3.8).

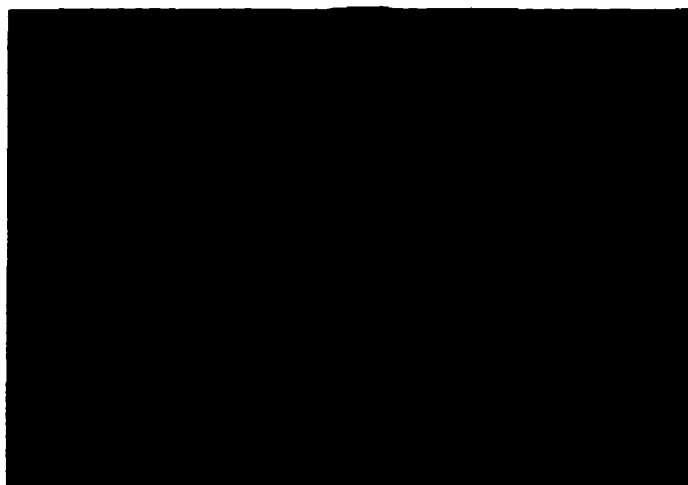


Figure 3.8 Gouttelette d'eau déposée sur la surface du film chitosane-xanthane pour la mesure de l'angle de contact.

Sur un même film, 4 gouttes d'eau sont déposées à des endroits différents.

Cinq films sont analysés par traitement ainsi que pour le contrôle.

3.3.2.3 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques sont déterminées en utilisant l'appareil Vitrodyne®V1000. Des tests de traction sont effectués sur des barres de films de 1 cm x 6 cm. Les pinces sont fixées sur l'ancrage assuré par les filtres à l'extrémité de chaque barre (figure 3.7).

Durant l'expérimentation, les échantillons sont constamment maintenus sous hydratation par aspersion d'eau distillée.

- L'acquisition de données est effectuée toutes les 0.25 secondes;
- La vitesse de traction est définie à 0.2 mm/seconde;
- La fréquence est de 200 Hertz;
- La cellule de charge utilisée est de 150 grammes.

Les tests sont effectués jusqu'à la rupture des films et les paramètres suivants sont déterminés :

- La force ultime;
- Le déplacement ultime;
- La rigidité.

Lors de cette étude, huit échantillons sont utilisés par traitement et contrôle.

3.3.2.4 Analyses mécaniques dynamiques

Les analyses mécaniques thermiques et dynamiques (AMTD) sont réalisées en utilisant l'appareil SEIKO-DMS210 en mode tension. La fréquence utilisée est de 1 Hz.

Les échantillons utilisés sont faits à partir de films pliés sur eux-même et compressés pour avoir des spécimens de 1 cm de large, 200 μ m d'épaisseur et 2cm de long.

3.3.2.5 Analyse de la topographie

En utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB), nous avons procédé à la détection des changements de surface au niveau des films.

Le microscope JOEL JSM-840A, opérant sous voltage accéléré 20 kV, est utilisé.

Chapitre 4. Résultats des études de la biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*

Ce chapitre constitue le premier article «In vitro and in vivo Biocompatibility of Chitosan-Xanthan Polyionic Complex», accepté par le journal «Journal of Biomedical Materials Research».

Dans ce chapitre, nous exposons les résultats de l'étude de la biocompatibilité de l'hydrogel Chitosane-xanthane obtenu par complexation de deux polymères : le chitosane et le xanthane.

Cette étude représente :

- la mesure de la cytotoxicité, *in vitro*, en utilisant une lignée de fibroblastes (L-929)
- la mesure de la réaction inflammatoire, *in vitro*, en utilisant une lignée de macrophages (J-774)
- la réponse tissulaire, *in vivo*, après implantation dans un modèle animal : le rat.

Pour déterminer la cytotoxicité, nous avons mis les cellules en contact avec différentes concentrations de particules. La viabilité cellulaire à court terme est déterminée pour la période de 1 à 5 jours. Pour les effets à long terme, nous avons soumis les particules à la dégradation dans du milieu de culture pendant 1, 7, 14 et 28 jours. Nous avons alors incubé les cellules avec les extraits et mesuré leur viabilité.

La réaction inflammatoire est déterminée en incubant les macrophages avec les particules et leurs extraits. Le dosage des cytokines TNF- α et IL-1 β ainsi que l'oxyde nitreux sont effectués dans les surnageants cellulaires.

La partie *in vivo* est conduite par implantation de pastilles, fabriquées après compression des particules du complexe, en sous-cutané, chez le rat. Les réactions cellulaires et tissulaires sont alors déterminées par microscopie optique et électronique à transmission.

Nous présentons ici le résumé en français suivi de l'article tel que soumis.

Un nouvel hydrogel, le chitoxanTM (Ch-X), possède un potentiel comme véhicule de médicaments à libération contrôlée. Il est obtenu après complexation de deux polysaccharides, le chitosane et le xanthane. Dans ce travail, nous avons étudié la biocompatibilité du complexe en utilisant deux modèles *in vitro* et *in vivo*. Les effets cytotoxiques des microsphères de Ch-X et de leurs produits de dégradation, à différentes concentrations, ont été évalués sur les fibroblastes (lignée L-929). Pour ce faire, le test MTT (3-(4,5 diméthylthiazole-2yl)-2,5 triphényl tétrazolium) est utilisé. Il est basé sur l'activité déshydrogénase mitochondriale des cellules, comme indicateur de la viabilité. La production des cytokines IL-1 β et TNF- α ainsi que l'oxyde nitreux (NO) par les macrophages (macrophage cell line J-774) sont examinés comme indicateurs de l'activation des cellules. La détermination de la biocompatibilité *in vivo* est effectuée pour des périodes allant de 1 à 12 semaines. Cette étude est réalisée en utilisant des

pastilles, obtenues par compression de particules de Ch-X, implantées en sous-cutané chez le rat Wistar mâle. La biocompatibilité et la dégradation du Ch-X sont évaluées par des études histologiques. Les analyses en microscopie optique et électronique à transmission (TEM) sont utilisées pour déterminer la réaction au corps étranger et la phagocytose de l'implant par les macrophages. L'exposition des fibroblastes aux particules de CH-X et à leurs produits de dégradation n'a pas montré d'effet cytotoxique tel que mesuré par le test MTT. La production du TNF- α s'est avérée dépendante de la concentration des particules alors que celle de l'IL-1 β s'est trouvée être dose-indépendante. Les extraits du Ch-X, à haute dose (10 mg/ml), ont stimulé la sécrétion du TNF- α , notamment après 28 jours de dégradation. Par contre, ils n'ont pas montré d'effet vis-à-vis de la production de l'IL-1 β , en comparaison avec le contrôle. L'effet des particules sur la sécrétion de l'oxyde nitreux est similaire à celui sur le TNF- α .

Les études histologiques ont montré la désintégration des pastilles, en particules qui se dégradent progressivement en plus petits fragments. Des fractions significatives de ces fragments sont ingérées par les macrophages après 12 semaines d'implantation. Les observations en microscopie optique ont montré une réaction faible au corps étranger, et l'épaisseur de la capsule fibreuse a diminué en fonction du temps d'implantation.

In vitro and in vivo Biocompatibility of Chitosan-Xanthan Polyionic Complex

Fatiha Chellat¹, Maryam Tabrizian¹, Severian Dumitriu², Esteban Chornet², Pierre Magny², Charles-Hilaire Rivard³, and L'Hocine Yahia¹

¹ Biomedical Engineering Institute, Biomechanics and Biomaterials Research Group,

Ecole Polytechnique, Montreal, Quebec, H3C 3A7, Canada

² Department of Chemical Engineering, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec,

J1K 2R1, Canada

³ Research Center, Sainte-Justine Hospital, Montreal, Quebec, Canada

Corresponding author: Maryam Tabrizian

Address: Ecole Polytechnique of Montreal

Biomedical Engineering Institute
P. O. Box 6079, Station Down Town
Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

Phone: (514) 340-4183

Fax: (514) 340-4611

e.mail: tabrizia@grbb.polymtl.ca

4.1 Abstract

A novel hydrogel, chitoxanTM (CH-X), has potential as a vehicle for controlled drug delivery. The hydrogel is obtained by complexation of two polysaccharides, chitosan and xanthan. In the present work we have investigated the biocompatibility of the complex using *in vitro* and *in vivo* models. The cytotoxic effects of CH-X microspheres as well as their degradation products at different concentrations have been assessed on fibroblasts (fibroblast cell line L-929) using MTT (3-(4,5 dimethylthiazole-2yl)-2,5 triphenyl tetrazolium). The test is based on mitochondrial dehydrogenase cell activity as an indicator of cell viability. IL-1 β and TNF- α cytokines as well as nitric oxide (NO) production by macrophages (macrophage cell line J-774) were examined as indicators of the cells activation. *In vivo* biocompatibility assessment was performed for periods varying from 1 to 12 weeks. This study was performed by using tablets obtained after compression of CH-X particles implanted at the subcutaneous level in male Wistar rats. CH-X biocompatibility and degradation were investigated using histological studies. Light and transmission electron microscopy (TEM) analyses were used to determine the foreign body reaction and the phagocytosis of the implants by macrophages. Fibroblasts exposition to CH-X particles and degradation products did not show cytotoxic effects as measured by MTT test. TNF- α production was dependent on CH-X particles concentration while IL-1 β production was found to be dose-independent. CH-X extract products stimulated TNF- α secretion when used at the highest concentration (10 mg/ml).

notably after 28 days degradation time. No effect was observed on IL-1 β production when CH-X extracts were used in comparison to the control. The effects of CH-X particles on NO secretion were similar as on TNF- α .

Histological studies showed that CH-X tablets break down into particles which progressively degrade into smaller fragments. A significant fraction of the fragments was ingested by the macrophages after 12 weeks of implantation. Light microscopy studies showed a weak foreign body reaction as a function of time and the fibrous layer thickness decreased with time of implantation.

KEYWORDS: Biocompatibility; Chitosan-Xanthan hydrogel; Cytokines; phagocytosis, histological studies.

4.2 Introduction

Hydrogels have been reported to be effective carriers for controlled drug delivery. Their biodegradability is a necessary condition for their use as drug delivery systems. Another key characteristic of hydrogels is their biocompatibility. This study focuses on the biocompatibility of a novel hydrogel chitosan-xanthan (CH-X) complex which have been previously studied as cell and enzyme immobilization agent^{1,2} and its chemical and physical properties reported³.

Chitosan (CH) and xanthan (X) involved in the formation of the complex are among the natural polysaccharides which have been extensively studied. Chitosan is a *N*-deacetylated form of chitin a (1→4)-linked 2-acetamide-2-deoxy-β-D-glucan. It has various degrees of substitution for *N*-acetyl groups. Chitosan displays amino and hydroxyl groups which can react or interact with other groups. Earlier studies demonstrated its nontoxic effect in animals⁴ and many investigations have been performed to explore its potential use in pharmaceutical and medical applications, mainly as drug delivery system⁵⁻⁹.

Xanthan (X), a polysaccharide derived from *Xanthomonas campestris* is widely used in the food and oil industries as a thickener and emulsifier. It has a pentasaccharide repeating unit structure. The main chain consists of (1→4)-β-D-glucose units with a terminal β-D-mannose, β-D-glucuronic acid and β-D-mannose side chain which has β-D-(1→2) and β-D-(1→4) linkages¹⁰. It possesses polyanionic properties which allows its interaction with polycation leading to an insoluble polyelectrolyte hydrogel formation. The schematic representation of the complex is given in figure 4.1. The hydrogel can be prepared as microspheres, films, particles, beads and sponges depending on the desired use. Since the CH-X biocompatibility remains to be investigated, this paper represents a first attempt to elucidate its biocompatibility as well as the inter-related biodegradability. CH-X particles and their extract products were used in this study. Evaluation of their biocompatibility was carried out with L929 fibroblasts cell line to determine the cytotoxicity and with J774 macrophages cell line to assess the inflammatory response.

To assess the cytotoxicity of the particles, MTT test was carried out on L929 cells according to the procedure described by Mosmann¹¹. The J774 macrophages were chosen as an in vitro model to evaluate the activation effects of CH-X particles on macrophages. These cells belong to the body defense system and they are known to be important mediators of inflammation and play an important role in immune regulation. Their exposure to foreign body substances results in their activation leading to a secretion of several factors that may directly participate in the tissue response to implanted biomaterials. Among these factors one could list coagulation factors, complement components and lysosomal enzymes¹²⁻¹⁴. Cytokines and nitric oxide (NO) are also secreted by the macrophages as indicators of the inflammatory response and they are known to induce other cells such as T lymphocytes to proliferate, synthesize proteins and additional factors which, in turn, enhance macrophage activation¹⁵⁻¹⁸. It has been demonstrated that macrophages are activated as a consequence of direct interaction with polymer materials and produce interleukin 1- β ¹⁹. Studies on reactive oxygen intermediates have been reported in murine models and their role in human macrophage mediated cytotoxicity established^{20,21}. NO production and efficacy as an immune effector molecule has been also demonstrated in murine models²². It is a free radical gas synthesized by nitric oxide synthase (NOS) and mediates the deleterious effects of the cytokines²³⁻²⁵.

In this study, TNF- α , IL-1 β and NO secretion as markers for macrophages activation were assessed.

The second aspect of the present study is based on the degradation behavior and biocompatibility of the CH-X particles *in vivo*. Tablets from compressed CH-X particles were implanted subcutaneously in male Wistar rats in the back of male Wistar rats at the interscapular level. Light and transmission microscopy were used to study the tissue response and polymer degradation for periods of 1, 2, 4, 8 and 12 weeks. The tissue response was evaluated by the estimation of the inflammatory response as well as the fibrous capsule thickness. Progressive fragmentation and internalization of CH-X particles by macrophages attested that the hydrogel degraded *in vivo*. The high extent degradation was observed as the implantation periods increase with an ongoing fragmentation and phagocytosing cells material invasion.

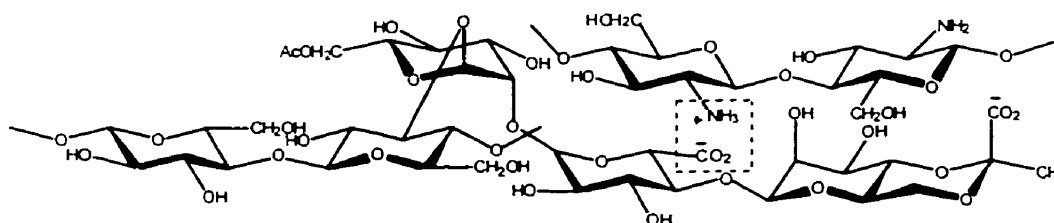


Figure 4.1 Schematic representation of Chitosan and Xanthan interaction to form the CH-X hydrogel.

4.3 Materials and methods

4.3.1 In vitro studies

Cell lines

Fibroblasts cell line L-929 (ATCC, CCL1 NCTC clone 929) and J-774 (ATCC) monocyte-macrophage cell-line were used for cytotoxicity tests and cytokines (IL-1 β and TNF- α) and nitric oxide (NO) assessment respectively.

Culture media

RPMI 1640 (Gibco Laboratories, No.1007688) containing 2mM L-glutamine was supplemented with 2.3 g/L of sodium bicarbonate, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco Laboratories, No. 1000415) and Penicillin-Streptomycin (100 units/ml-100 μ g/ml) solution (Gibco Laboratories, No. 1006400), was employed for macrophages culture.

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Sigma) supplemented with the same ingredients than for macrophages culture medium (except L. Glutamine) was used for fibroblasts culture.

Reagents

MTT: The yellow tetrazolium dye, 3-(4,5 dimethylthiazole-2yl)-2,5 triphenyl tetrazolium bromide was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Elisa Kits for cytokines: kits for TNF- α and IL-1 β assessment were purchased from Biosource Int. (Camarillo, CA, USA).

Samples

Xanthan with a molecular weight of 300 000 (Nutrasweet-Kelco, San Diego, CA, USA) and chitosan with a molecular weight of 150 000 and a degree of acetylation of 12 % (Kemestrie Inc. Sherbrooke, Canada) were used to prepare chitosan-xanthan complex.

Chitosan-Xanthan complex preparation

6.5 g of chitosan were dissolved in 250 ml of HCl 1N. The solution was stirred for 1 hour and 200 ml of deionized distilled water were added. After complete dissolution of the chitosan, the volume was adjusted to 900 ml. The solution was then neutralized with NaOH to pH 5.7 and the volume completed to 1 liter. Xanthan solution was prepared by dissolving 6.5 g of xanthan in 1 liter of deionized distilled water. The CH and X solutions were mixed under vigorous stirring to form the CH-X hydrogel. After filtration, several washings with acetate buffer (6.5 ml of glacial acetic acid and 38.3g of sodium acetate in

1 liter of water), and deionized distilled water, the hydrogel was freeze dried. The particles were sterilized with ethylene oxide and maintained under aeration until use.

Cytotoxicity studies

Cytotoxicity studies were performed by cell direct contact with CH-X particles and their extract products.

Direct contact assay

L-929 mouse fibroblasts cells were seeded in 96 wells plates at 1×10^4 cells per well. They were allowed to grow to confluence in DMEM under 95%-5% O₂-CO₂ humidified atmosphere. The medium was then removed and replaced with a fresh one containing different concentrations of CH-X particles (0-10 mg/ml). At different periods (1-5 days) the cell viability was determined by the MTT test.

Cell contact with CH-X extract products

10 mg/ml of CH-X particles were allowed to degrade in complete culture medium for periods varying from 1 day to 28 days. To mimic the physiological conditions, the solutions were shaken at 240 rpm at 37°C. For different time periods, the solutions were stored at -20°C until the end of extraction periods. The solutions were then allowed to settle and the extracts assessed for cytotoxicity. Extracts' dilution was carried out in the ratio 1/100; 1/20; 1/10 ;1 /2 and 1/1. After confluence, the cells were treated with different extracts' dilution for 24 hours and cell viability assessed as described above.

MTT test

50 μ l of 1mg/ml MTT solution in a fresh culture medium were added to each well. Following 4 hours of additional incubation time at 37°C. Isopropanol-HCl (0.1N) was added to each well to insure the solubilization of the crystals. The optical density values were determined using a microplate reader (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 570 nm.

IL-1 β and TNF- α production

IL-1 β and TNF- α were measured in the supernatant, using a sandwich ELISA method. The optical density values were read at 450 nm by a spectrophotometer (Beckman, Fullerton, CA, USA). The concentrations of the 2 cytokines in cell media were measured and expressed in pg/ml, according to a standard dilution curve. The minimum detectable dose of IL-1 β and TNF- α was below 7 pg/ml and 3 pg/ml respectively.

Nitrite assay

Nitric oxide (NO) production was evaluated by measuring the nitrite (NO₂⁻) -its stable metabolic product- formation in cell culture supernatants. Nitrite concentration was assessed according to Ding et al.²⁶. 50 μ l aliquots were removed from each well and incubated with an equal volume of Griess reagent (1% sulphanilamine ; 0.1% naphthylene diamine dehydrochloride ; 2.5% orthophosphoric acid) for 10 minutes at room temperature. The absorbance at 543 nm was determined by ELISA reader (Beckman,

Fullerton, CA, USA). Dilutions of sodium nitrite in were used to create a standard curve. The samples were read against the blank which was composed of 50 µl of medium.

Data analyses

Statistical analyses were performed by using the "analysis of variance (ANOVA)" test.

4.3.2 In vivo studies

Samples

Tablets of 1 cm in diameter and 1 mm in thickness were made of CH-X particles (100 mg) after progressive compression with a hydraulic press (Carver Model C, Summit, N.J.) at 5000, 10000, 15000 and 20000 LB for one minute. The tablets were sterilized with ethylene oxide and maintained under aeration for several days before implantation.

Animals

Fourty male Wistar rats weighing (200-250 g) (Charles-River, St-Constant, Qc., Canada) were used for *in vivo* study. The Canadian Council on Animal Care Regulations were observed all along the *in vivo* experiments. The animals were kept under observation and for adaptation during 4 days before experimentation with access to a standard diet and water *ad libitum*. Before tablets implantation, the animals were given Ketamine (90 mg/Kg) and Xylazine (10 mg/Kg) by intraperitoneal injection. The back of the animals was then shaved and swabbed with Betadine and isopropyl alcohol. An incision of 2 cm

long was made at the interscapular level and a subcutaneous pouch was opened. A single CH-X tablet was inserted in the pouch and the wound closed by suturing. After each implantation period, animals were sacrificed by anaesthetic overdose. Immediately after, the implants and the surrounding tissue were excised and washed in cold PBS before fixation. Each implant was cut in two parts for transmission electron and light microscopy studies.

Transmission electron microscopy studies

Fixation of samples for transmission electron microscopy was carried out by the immersion of the specimens for 2 hours at 4°C in a primary fixative containing 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4. The specimens were then post-fixed for 2 hours at 4°C in 2% osmium tetroxide (OsO₄) in the same buffer. Dehydration was conducted using increased concentrations of ethanol solutions (30 to 100%) and polypropylene oxide. The samples were then infiltrated with a mixture of Epon/propylene oxide 1:1 and embedded in Epon 812. Ultrathin (60 nm) sections were cut on a LKB ULTRATOME III, deposited on 200 mesh copper grids, and counter-stained with lead citrate and uranyl acetate. Ultrastructural studies were performed using a JOEL JEM 100CX operated at 60 kV.

Light microscopy studies

The specimens were fixed by immersing into 10 vol % buffered formalin solution and then embedded in paraffin. 5 μm transverse sections were made and stained with Haematoxylin-Phloxin-Saffron (HPS).

4.4 Results

4.4.1 In vitro cytotoxicity studies

CH-X particles did not lead to cell growth inhibition (Fig. 4.2). The CH-X extract products did not show any cytotoxic effect regardless of degradation time periods and concentrations used (Fig. 4.3). Analysis of variance (ANOVA) tests were performed and showed that the concentrations used had no significant effect on cell growth as well as the incubation time.

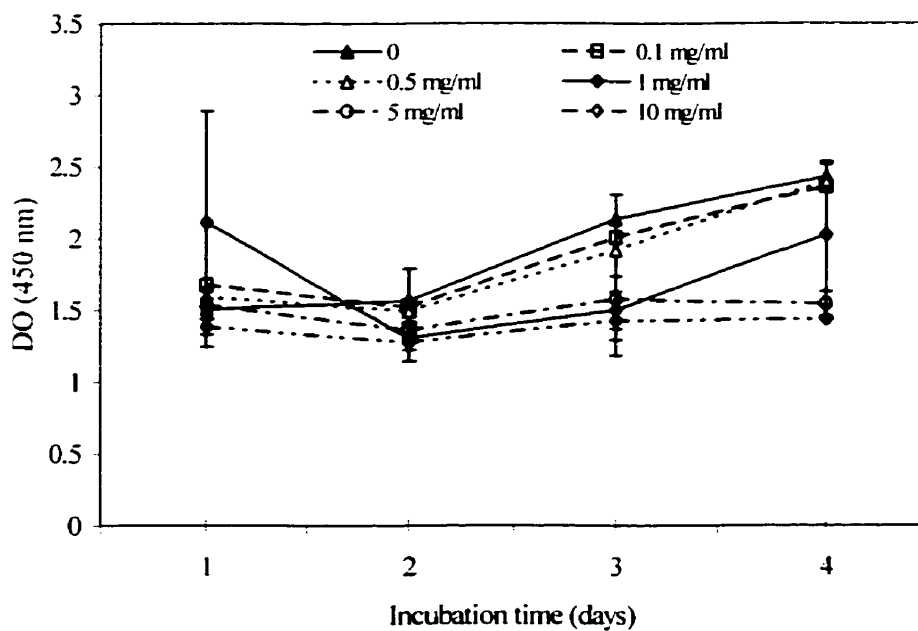


Figure 4.2 Effects of CH-X particles on L-929 cell viability particles (direct contact)

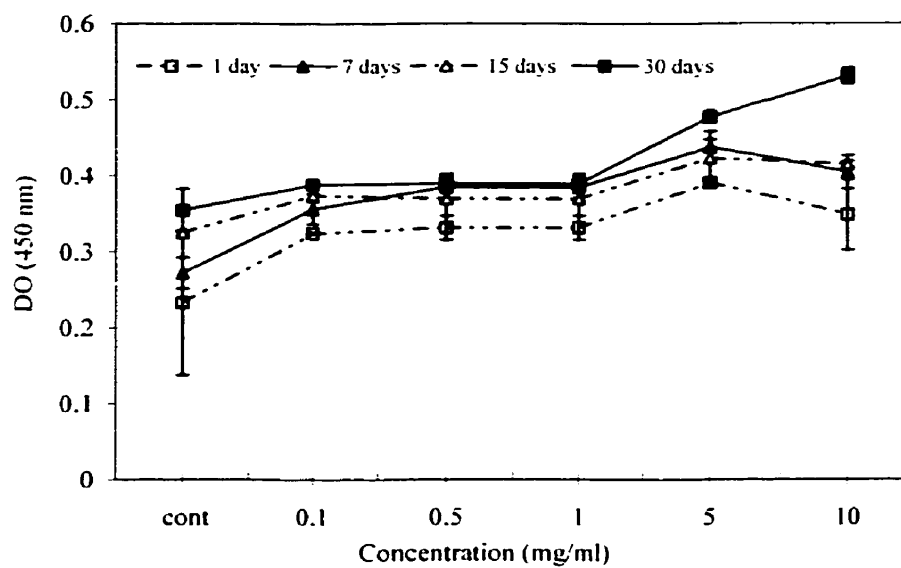


Figure 4.3 Effects of CH-X extract products on L-929 viability

Cytokines production by macrophages

TNF- α production by macrophages was stimulated by CH-X particles for the concentration of 1mg/ml. This effect was more evident at higher concentration (10 mg/ml) (Fig. 4.4). However, the difference was statistically not significant. For lower concentrations and control, TNF- α secretion was below the detection threshold. J-774 macrophages were significantly stimulated for TNF- α production with CH-X products after 7, 14 and 28 days extraction when used at 10 mg/ml. This effect seems to be time-dependent (Fig. 4.5). The same effect was shown only for the degradation products at the concentration of 10 mg/ml after 7, 14 and 28 days of extraction (Fig. 4.5). IL-1 β production was enhanced after macrophages incubation with CH-X particles while the concentration did not affect the secretion level (Fig. 4.6). Contrary to the particles, extract products did not significantly influence IL-1 β production (Fig. 4.7).

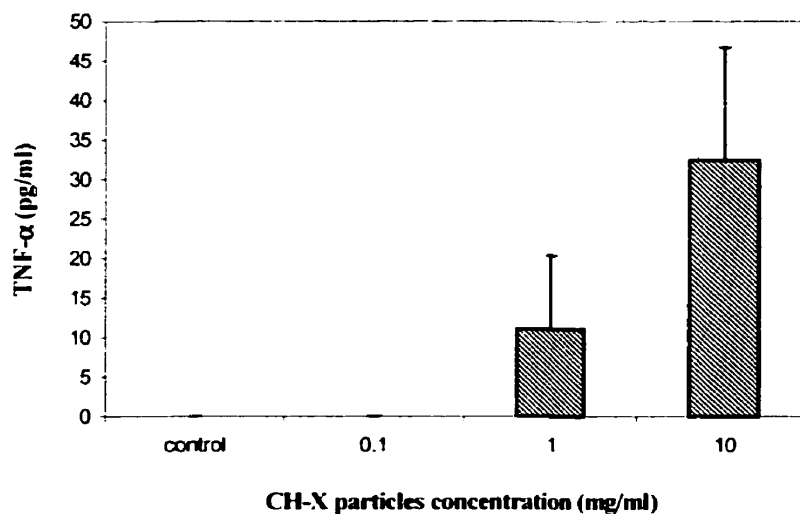


Figure 4.4 Effects of CH-X particles on TNF- α production by J-774 macrophages

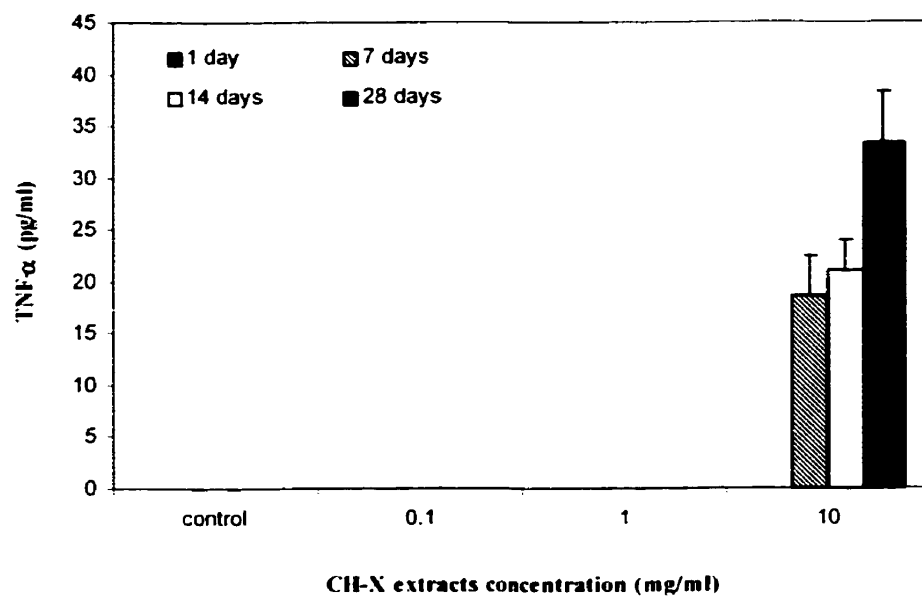


Figure 4.5 Effects of CH-X extracts on TNF- α secretion

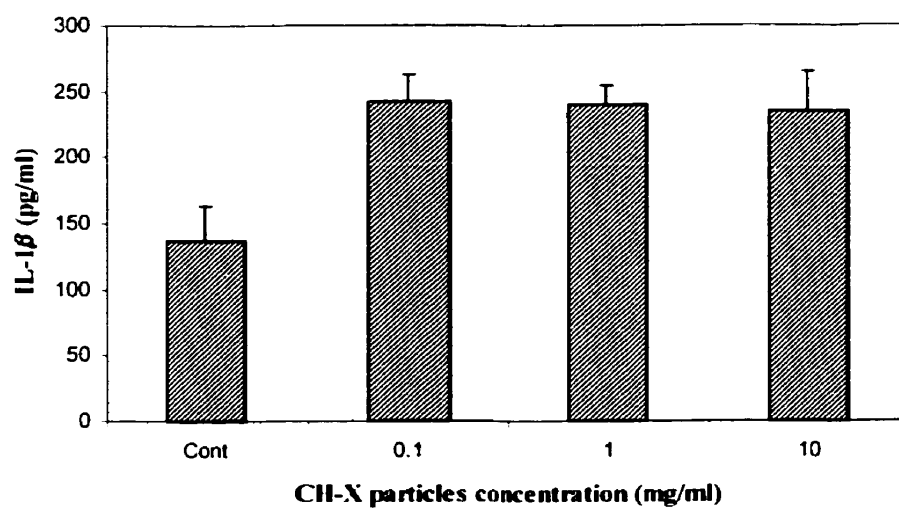


Figure 4.6 Effects of CH-X particles on IL-1 β secretion

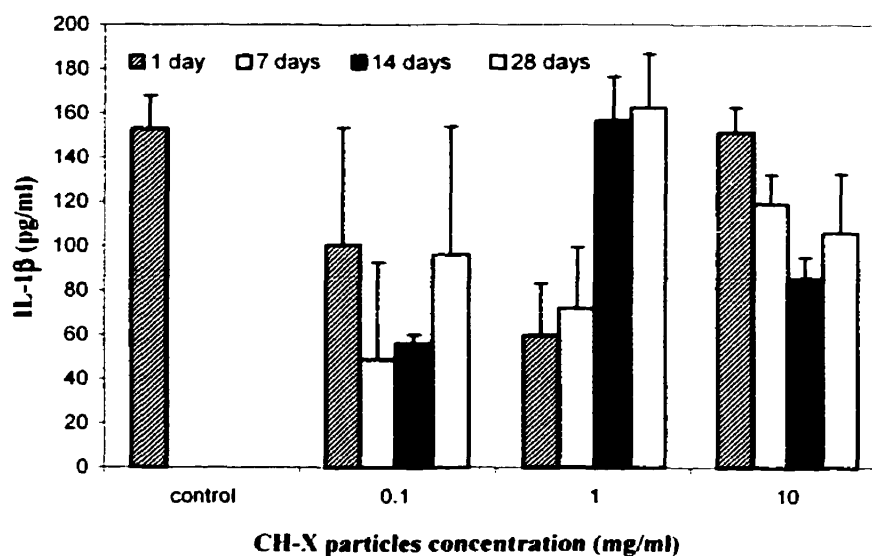


Figure 4.7 Effects of CH-X extract products on IL-1 β secretion

Nitrite assay

Non-stimulated macrophages generated a similar level of NO radical (measured as NO_2^- concentration) as those treated with 0.1 and 1 mg/ml of CH-X microspheres. A slight increase in the nitrite secretion is observed for 10 mg/ml CH-X treated cells (Fig. 4.8).

The extract products at 10 mg/ml induced a higher level of NO after 7, 14 and 28 days. Whereas, after 1 day extraction, no difference was seen with the control and with the lower concentrations (Fig. 4.9).

The results obtained were statistically significant with $p < 0.05$.

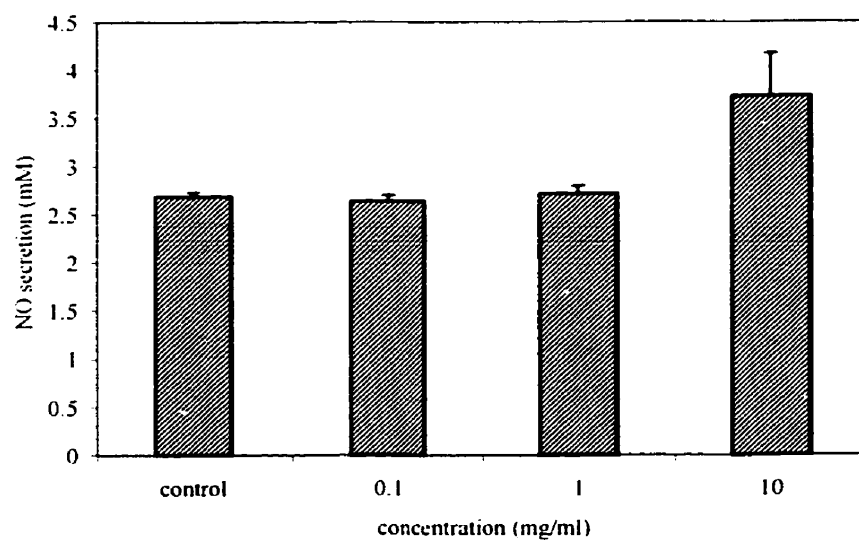


Figure 4.8 Effects of CH-X particles on NO secretion by J-774 macrophages

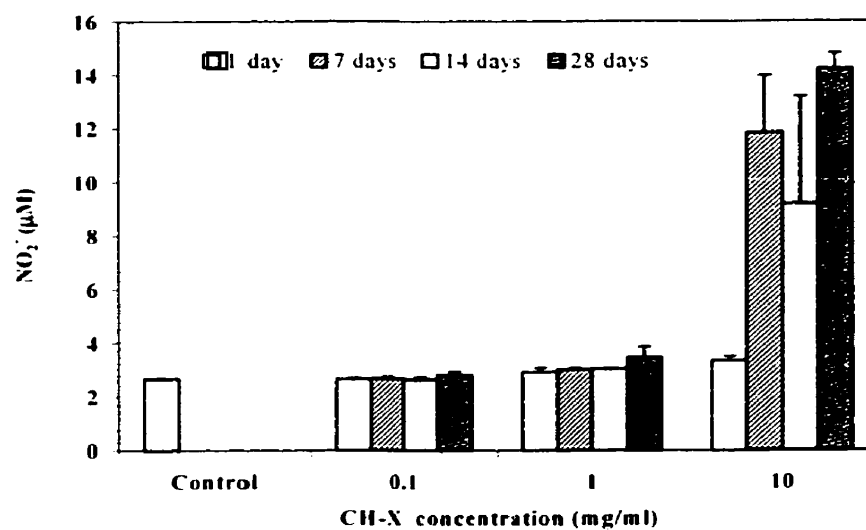


Figure 4.9 Effects of CH-X extract products on NO secretion by J-774 macrophages

4.4.2 In vivo biocompatibility study

Light microscopy studies showed that CH-X tablets implantation in subcutaneous tissue resulted in an acute inflammation reaction after 1 week of implantation (Fig. 4.10). Angiogenesis is required to manufacture the extracellular matrix where fibroblasts require oxygen and nutrients. In fact, blood vessels are observed in the newly formed collagenous capsular tissue (Fig. 4.11).

As the implantation period increases, the particles are individualized and fragmented (Fig. 4.12).

The macrophages are seen growing into CH-X particles ongoing fragmentation and phagocytose them (Fig. 4.13). The phagocytosis of CH-X particles is evidenced by TEM micrograph where fragments are observed inside macrophages (Fig. 4.15) after 4 weeks of implantation.

After 8 weeks of implantation, the CH-X particles were surrounded and individually encapsulated by fibrous connective tissue which was infiltrated by macrophages and fibroblasts lying along CH-X particles (Fig. 4.13 and Fig. 4.16).

After 12 weeks TEM micrograph showed phagocytosing cells surrounding CH-X particle highly packed with the material fragments (Fig. 4.17) without signs of cell damage such as rough endoplasmic reticulum or swollen mitochondria. The thickness of the fibrous tissue also diminished and the inflammatory reaction almost disappeared around the particles as shown by light microscopy (Fig. 4.14).



Figure 4.10 LM micrograph (Original magnification x 625) of acute inflammatory reaction developed against peripheral CH-X particles (P) after 1 week implantation in rat subcutaneous tissue.



Figure 4.11 LM micrograph (original magnification x 156) showing dense fibrosis formation with blood vessels (arrows) and inflammatory reaction around CH-X particles (P) after 2 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.



Figure 4.12 LM micrograph (original magnification x 390) showing CH-X particles (P) individualization, invasion by the host cells and fragmentation (F) after 4 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.

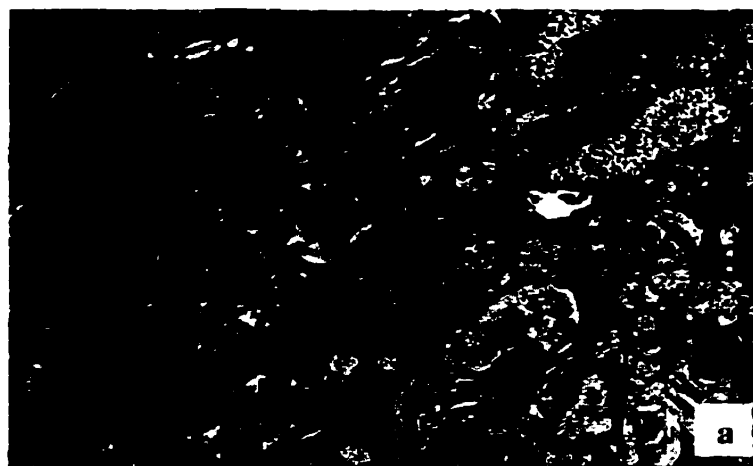


Figure 4.13 LM micrograph (Original magnification x 156) showing more CH-X particles fragmentation and degradation and fibrous tissue (FT) pre-organization after 8 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.

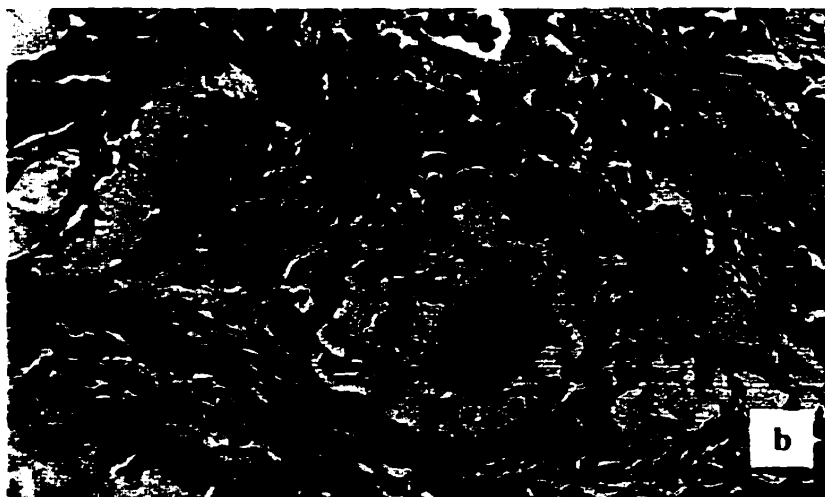


Figure 4.13 LM micrograph (Original magnification $\times 625$) showing CH-X particles (P) encapsulation by fibrous connective tissue (FT) and ingestion by phagocytosing cells (head arrows) after 8 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.

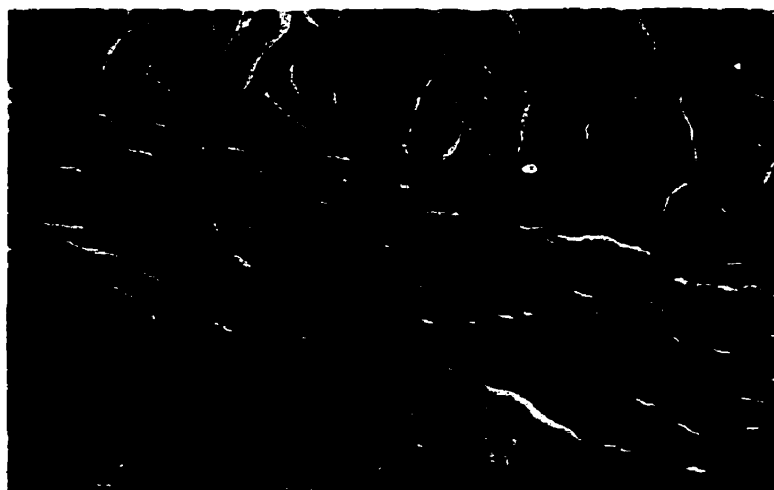


Figure 4.14 LM micrograph (Original magnification $\times 156$) showing a well organized fibrous tissue (FT) with a decrease in its thickness after 12 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.

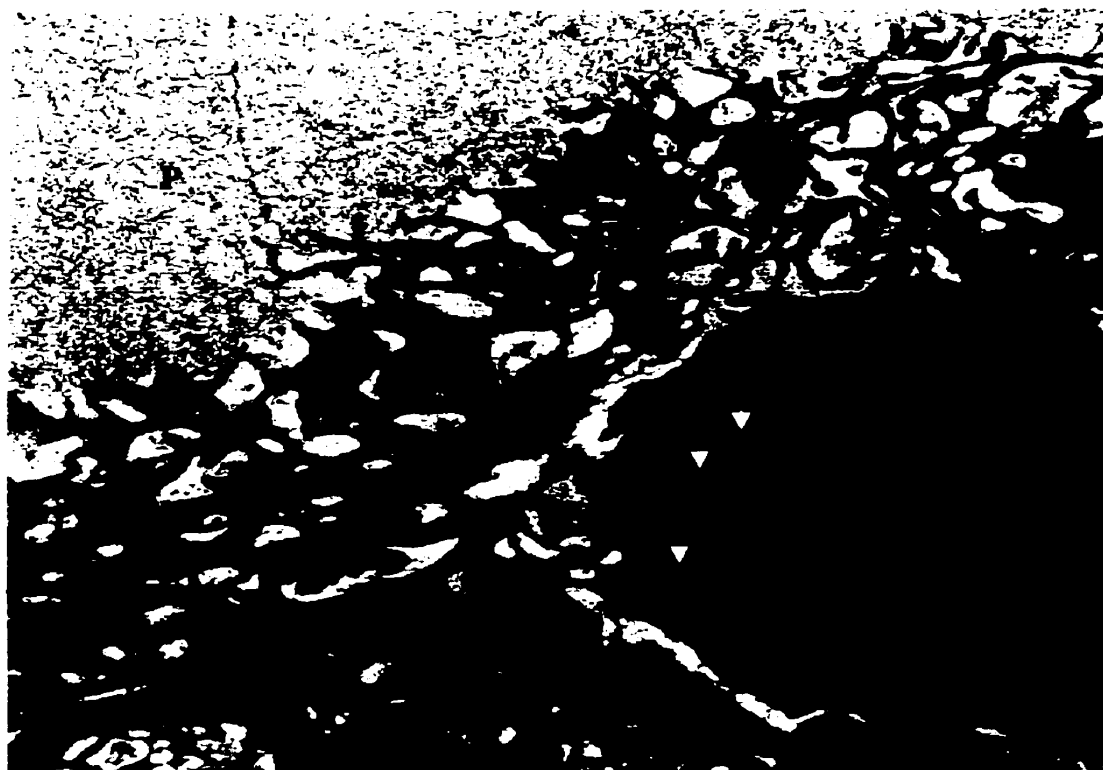


Figure 4.15 TEM micrograph (original magnification x 8300) showing CH-X particle (P) ongoing biodegradation. Fragments of the hydrogel (White arrows) are shown internalized by macrophages (Black arrow) after 4 weeks implantation in rat subcutaneous tissue.

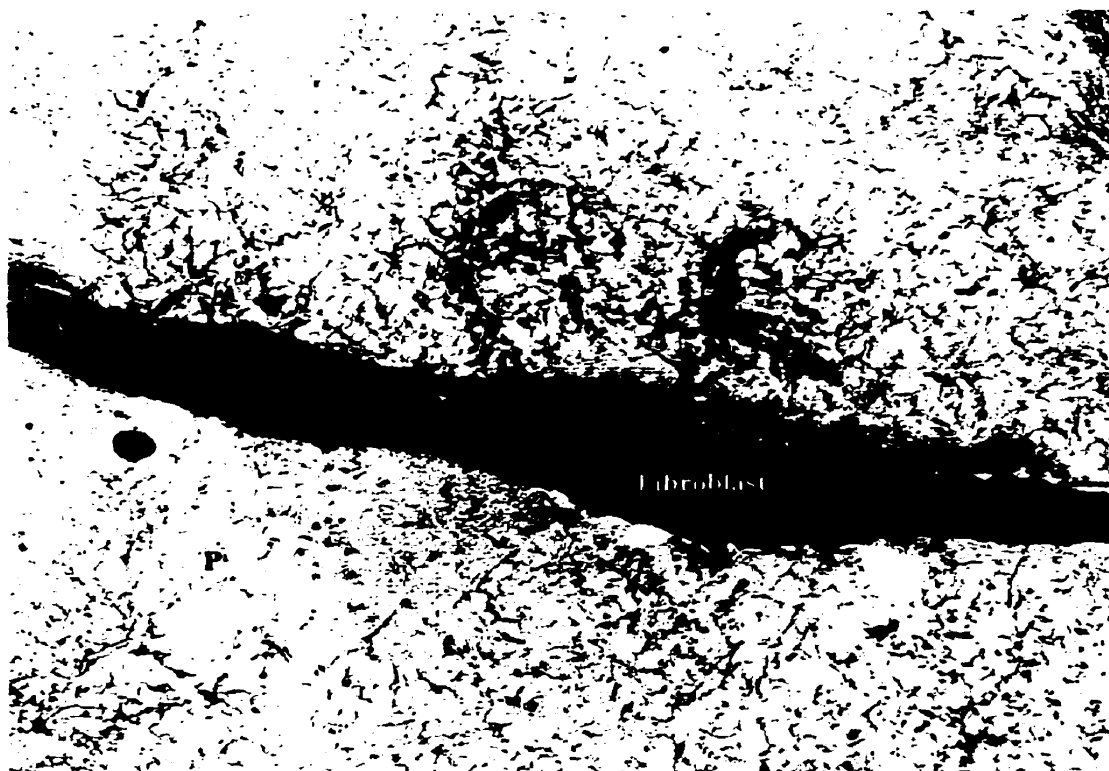


Figure 4.16 TEM micrograph (original magnification x 8300) showing fibroblast adhering along CH-X particles (P) after 8 weeks of implantation in rat subcutaneous tissue.

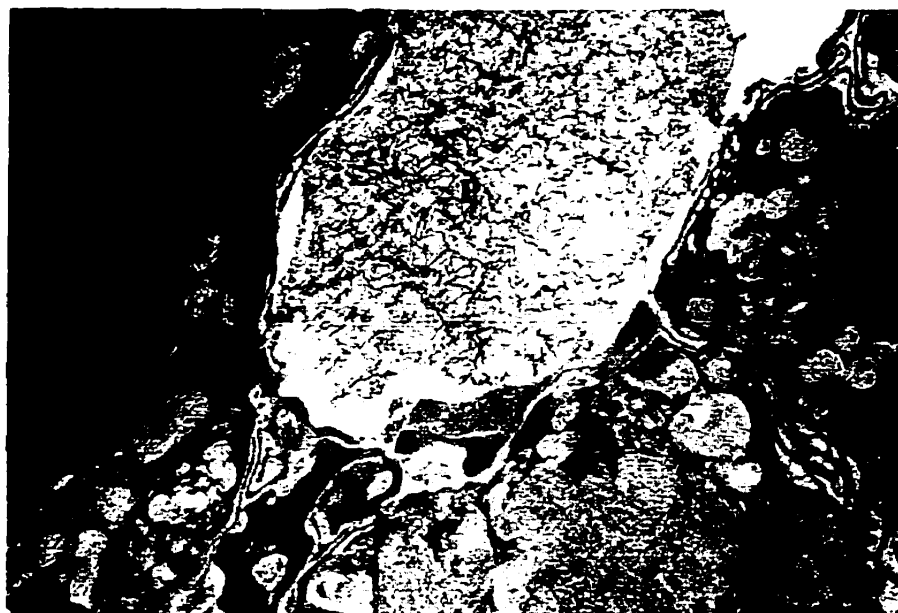


Figure 4.17 TEM micrograph (original magnification x 8300) showing CH-X particle (P) surrounded by macrophages highly packed with the material fragments (F) after 12 weeks of implantation in rat subcutaneous tissue.

4.5 Discussion

In this study, particles of CH-X and degradation products were assessed for *in vitro* biocompatibility by measuring their effects on L-929 fibroblasts viability and macrophages stimulation. *In vivo* biocompatibility was assessed by CH-X tablets implantation. Based on cytotoxic effects studies of CH-X particles, a growth inhibition is shown for the concentrations of 5 and 10 mg/ml. This effect could be due to the pressure exerted by the particles weight. In fact, no appreciable cell viability decrease was shown

for the high concentrations. Moreover, it must be pointed out that for polymer biocompatibility studies, the concentrations used in our study were higher compared to the results in the literature. Liquid extracts of materials are used for cytotoxicity evaluation of leachables. Our study showed that CH-X extract products did not affect the L-929 cell viability even used at high concentrations.

Macrophages are responsible for tissue repair through the release of several factors such as cytokines. IL-1 and TNF- α are multifunctional cytokines having local and systemic effects during immunological and inflammatory processes. Our study demonstrated clearly that macrophages incubation with CH-X particles were activated to produce IL-1 β with a maximal level for the dose of 0.1 mg/ml whereas the extract products did not show this enhancement. This could suggest that IL-1 production occurred as a consequence of CH-X fragments phagocytosis. The size of the particles could be not phagocytosable. However, in addition to size and concentration of particles, it seems that their composition plays a major role in macrophage stimulation^{27,28}. It has also been suggested that internalization of particles is not required and that cell membrane-particle interaction is capable to induce the cells response²⁹. TNF- α and NO secretion are influenced in the same way by CH-X extract products with a slight sensitivity for TNF- α secretion. This could be explained by the fact that synthesis of NO is closely regulated by a stimuli such as TNF- α and was found to be stimulated in a dose-dependent manner by the cytokine^{30,31}.

Macrophages also play an important role in the phagocytosis of the material and its degradation *in vivo*. The inflammatory reaction is essential for preparing the wound for the production of a new extracellular matrix. Cytokines and growth factors released by the inflammatory cells attract the fibroblasts into the wound to initiate the reconstruction process. Their presence is shown in figure 4.16 and the presence of collagen attest on the healing process (Fig. 4.11). During this phase, the amount of collagen increases. The fibrous capsule formed did not increase as the degradation of the complex was taking place.

The phagocytic behavior seems to be influenced by the surface properties of hydrogels³². The CH-X particles used for our study possess high hydrophilic properties which could contribute to macrophage stimulation. A study performed by Nishimura et al.³³ showed the importance of hydrophilic surface properties of deacetylated chitin beads to contact and stimulate macrophages. As demonstrated for other polymers³⁴, the high porosity combined to the hydrophilicity as well as the mechanical properties weakness of the CH-X constitute important factors regarding their *in vivo* biodegradation. Moreover, previous study on chitosan reported its preferential degradation in acidic conditions³⁵. Same observations were made on chitosan and CH-X complex degradation in a parallel performed study where almost complete disintegration of the hydrogel is shown in acidic physiological medium³⁶. The inflammatory site having acidic pH represents an adequate site for CH-X degradation acceleration in parallel with macrophage phagocytosis leading to polymer resorption upon implantation^{37,38}. Degradation study on the animal model used indicated a phagocytosis of the CH-X particles by macrophages which can lead to

the entire resorption of the hydrogel. However, the short-term implantation experiment did not allow to investigate the full process of degradation and resorption. To determine the effect the size of the tablets and CH-X concentration, long-term in vivo study ought to be conducted. CH-X hydrogels used in this study were prepared from the same type of chitosan with a specific molecular weight and degree of acetylation. It may be important to investigate other types of CH-X hydrogels since their composition seems to be a determinant factor during the degradation process. Studies on biodegradable polymers reported that molecular weight and polymer composition are important and could influence the biodegradation rate³⁹⁻⁴¹. In vivo studies reported the degradation of chitosan ascorbate in the oral cavity in about 2 months⁴². Another study showed no significant biodegradation of glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres over a period of 3 months in rats skeletal muscle⁴³.

As well, the biocompatibility could be affected because significant differences in biological response may occur⁴⁴⁻⁴⁶. Smetana demonstrated, using different types of hydrogels that the difference in chemical groups affects the extent of protein adsorption, macrophage spreading and their fusion into multinucleate foreign-body giant cells⁴⁷. The study of the influence of hydrogels structure on human monocyte adhesion and phenotypic characteristics have also been reported⁴⁸. This is of great interest since macrophages derive mainly from circulating monocytes whose development is influenced by the formation of adhesive contacts⁴⁹.

4.6 Conclusion

In vivo studies based on light microscopy observations showed a recruitment of specific cell populations responsible of the preparation of wound repair and deposition of new matrices. The diminution in fibrous layer thickness and the absence of necrosis indicated a good in vivo tolerance of the hydrogel. TEM studies show no signs of cells damage, i.e. swollen mitochondria and rough endoplasmic reticulum, after CH-X ingestion. The large amount of phagocytosed CH-X fragments did not led to cell death, neither to release of cell material. The degradation rate of CH-X hydrogel is important for controlling the inflammatory reaction and the biocompatibility. Parameters such as dilution or concentration of degradation products may determine the ultimate effect of the CH-X hydrogels on the surrounding cells.

Based on its extreme hydrophilicity, high porosity allowing its invasion by phagocytic cells and further resorption and clearance from the body as well as its acceptable biocompatibilty, CH-X may constitute a good candidate as a drug delivery vehicle. The results are all the more encouraging if we consider that the dose of CH-X particles administred is as high as 100 mg and concentrated at one site. According the in vitro tests, CH-X hydrogels exhibit good biocompatible properties. Their degradation products did not lead to cytotoxic effects. Assessment of IL-1 β and TNF- α as well as NO secretion indicated an activation of macrophages.

4.7 References

1. C.-H. Chu, H. Kumagai, and K. Nakamura, "Application of polyelectrolyte complex gel composed of xanthan and chitosan to the immobilization of *Corynebacterium glutamicum*," *J. App. Polym. Sci.*, **60**, 1041-1047 (1996.)
2. S. Dumitriu, and E. Chornet, "Immobilization of xylanase in chitosan-xanthan hydrogels," *Biotechnol. Prog.*, **13**, 539-545 (1997.)
3. S. Dumitriu, P. Magny, D. Montané, P.F. Vidal, and E. Chornet, "Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan: Their properties as supports for enzyme immobilization," *J. Bioactive and Compatible Polymers*, **9**, 184-209 (1994.)
4. D.R. Landes, W.A. Bough: "Effects of chitosan – a coagulating agent for food processing wastes- in the diets of rats on growth and liver and blood composition," *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, **15**, 555-563 (1976.)
5. V. Dodane, and V.D. Vilivalam : "Pharmaceutical applications of chitosan," *Pharm. Sci. Tech. Today*, **1**, 246-253 (1998.)
6. D.N.-S. Hon : "Chitin and chitosan : medical applications" in *Polysaccharides*, 1995, pp : 631-649.
7. W.G. Malette, H.J. Quigley, R.D. Gaines, N.D. Johnson, and W.G. Rainer: "Chitosan: A new hemostatic," *Ann. Thorac. Surg.*, **36**, 55-58, (1983.)
8. G. Biagini, A. bertani, R. Muzzarelli, A. Damedei, G. DiBenedetto, A. Belligoli, and G. Riccotti, "Wound dressing with N-carboxybutyl chitosan," *Biomaterials*, **12**, 281-286 (1991.)
9. L.Y. Chung, R.J. Schmidt, P.F. Hamlyn, B.F. Sagar, "Biocompatibilty of potential wound management products: Fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture," *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 463-469 (1994.)
10. Y.M. Elçin, "Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres," *Biomaterials*, **16**, 1157-1161 (1995.)
11. T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival :

- application to proliferation and cytotoxicity assays." *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983.)
12. P.M. Henson, "Mechanisms of exocytosis in phagocytic inflammatory cells." *Am. J. Pathol.*, **101**, 494-514 (1980.)
 13. H.A.Jr. Chapman, Z.Vavrin, and J.B.Jr. Hibbs, "Macrophage fibrinolytic activity : identification of two pathways of plasmin formation by intact cells and of a plasminogen activator inhibitor," *Cell*, **28**, 653-662 (1982.)
 14. C. Bentley, B. Zimmer, and U. Hadding, "The macrophage as a source of complement components" in *Lymphokines, a Forum for Immunoregulatory Cell Products*, E. Pick (Ed), New York, 1981, pp. 197-230.
 15. T.L. Bonfield, E.D. Colton, and J.M. Anderson, "Plasma protein adsorbed biomedical polymers : activation of human monocytes and induction of interleukin-1," *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 535-548 (1989.)
 16. K.M. Miller, V. Rose-Caprara and J.M. Anderson, "Generation of IL1-like activity in response to biomedical polymer implants: a comparison of in vitro and in vivo models." *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 1007-1026 (1989.)
 17. K.M. Miller, and J.M. Anderson, "Human monocyte/macrophage activation and interleukin-1 generation by biomedical polymers." *J. Biomed. Mater. Res.*, **22**, 713-731 (1988.)
 18. D. Barkley, M. Feldmann, and R.N. Maini, "The detection by immunofluorescence of distinct cell populations producing interleukin-1 in activated human peripheral blood." *J. Immunol. Methods*, **120**, 277-283 (1989.)
 19. T.L. Bonfield, J.M. Anderson, "Functional versus quantitative comparison of IL-1 β from monocytes/macrophages on biomedical polymers." *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1195-1199 (1993.)
 20. R.B. Johnston, "*Lymphokines*" E. Pick, eds. Academic Press, New York, 1981, p. 33.
 21. T.L. Gerrard, J.J. Terz, and A.M. Kaplan, "Cytotoxicity to tumor cells of monocytes from normal individuals and cancer patients." *Int. J. Cancer*, **26**, 585 (1980.)

22. D.J. Stuehr, and M.A. Marletta, "Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7738 (1985.)
23. C.F. Nathan, "Secretory products of macrophages," *J. Clin. Invest.*, **79**, 319-326 (1987.)
24. X. Zang, D.C. Morrison, "Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages," *J. Exp. Med.*, **177**, 511-516 (1993.)
25. P. Kubes, M. Suzuki, and D.N. Granger, "Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4651-4655 (1991.)
26. A.H. Ding, C.F. Nathan, and D.J. Stuehr, "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production," *J. Immunol.*, **141**, 2407-2412 (1988.)
27. A.S. Shanbhag, J.J. Jacobs, T.T. Glant, "Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro," *J. Orthop. Res.*, **13**, 792-801 (1995.)
28. T. Rae, "The macrophage response to implant materials-with special reference to those used in orthopaedics," *Crit. Rev. Biocompat.*, **2**, 97-126 (1986.)
29. A.S. Shanbhag, J. Yang, J. Lilien, and J. Black, "Decreased neutrophil respiratory burst on exposure to cobalt-chrome alloy and polystyrene in vitro," *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 185-195 (1992.)
30. Q.W. Xie, H.J. Cho, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T. Lee, A. Ding, T. Trosko, and C. Nathan, "Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages," *Science*, **256**, 225-228 (1992.)
31. J. Liversidge, P. Grabowski, S. Ralston, N. Benjamin, and J.V. Forrester, "Rat retinal pigment epithelial cells express an inducible form of nitric oxide synthase and produce nitric oxide in response to inflammatory cytokines and activated T cells," *Immunology*, **83**, 404-409 (1994.)
32. Y. Tabata, and Y. Ikada, "Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages," *Adv. Polym. Sci.*, **94**, 107-141 (1990.)
33. K. Nishimura, S. Nishimura, H. Seo, N. Nishi, S. Tokura, and I. Azuma, "Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially

- deacetylated chitin." *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, 1359-1372 (1986.)
34. B.J. Pol, P.B. Van Wachem, M.J. Van Luyn, L. Van Der Does, A. Bantjes, "In vivo testing of crosslinked polyethers.I. Tissue reaction and biodegradation. " *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 307-320 (1996.)
 35. C. Yomota, T. Komuro, and T. Kimura, "Studies on the degradation of chitosan films by lysozyme and release of loaded chemicals." *Yakugazu-Zasshi*, **110**, 442-448 (1990.)
 36. F. Chellat, M. Tabrizian, S. Dumitriu, E. Chornet, C.-H. Rivard and L'H. Yahia, "HPLC analysis of Chitosan-Xanthan microspheres degradation." *Proc. Canad. Biomater. Soc. Conf.* (1998.)
 37. F.R. Rozema, W.C. de Bruijn, R.R.M. Bos, G. Boering, and A.J. Pennings, "Late tissue response to bone- plates and screws of poly (L-lactide) used for fracture fixation of the zygomatic bone plate," *Adv. Biomater.*, **10**, 349-355 (1992.)
 38. J.M. Anderson, and K.M. Miller.: "Biomaterial biocompatibility and the macrophage," *Biomaterials*, **5**, 5-10 (1984.)
 39. D.E. Cutright, B. Perez, J.D. Beasley, W.J. Larson, and W.R. Rosey, "Degradation rates of polymers and copolymers of polylactic and polyglycolic acids," *Oral Surg.*, **37**, 142-152 (1974.)
 40. A.M. Reed, and D.K. Gilding, "Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo-and copolymers : 2. In vitro degradation." *Polymer*, **22**, 494-498 (1981.)
 41. D.K. Gilding, and A.M. Reed, "Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo-and copolymers : 1." *Polymer*, **20**, 1459-1464 (1979.)
 42. R. Muzzarelli, G. Biagini, A. Pugnalluni, O. Filippini, and V. Baldassarre, "Reconstruction of paradontal tissue with chitosan." *Biomaterials*, **10**, 598-603 (1989.)
 43. S.R. Jameela, and A. Jayakrishnan, "Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle : studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle." *Biomaterials*, **16**, 769-775 (1995.)
 44. P. De Vos, B. De Haan, and R. Van Schilfgaarde, "Effect of the alginate

- composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules." *Biomaterials*, **18**, 273-278 (1997.)
45. L.J. Suggs, M.S. Shive, C.A. Garcia, J.M. Anderson, and A.G. Mikos. "In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogels," *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**, 22-32 (1999.)
 46. Q. Garrett, R.W. Garrett, B.K. Milthorpe. "Lysozyme sorption in hydrogel contact lenses. " *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 897-903 (1999.)
 47. K.Jr. Smetana, "Cell biology of hydrogels." *Biomaterials*, **14**, 1046-1050 (1993.)
 48. K.Jr. Smetana, J. Lukas, V. Paleckova, J. Bartunkova, F.-T. Liu, J. Vacik, and H.-J. Gabius, "Effect of chemical structure of hydrogels on the adhesion and phenotypic characteristics of human monocytes such as expression of galectins and other carbohydrate-binding sites," *Biomaterials*, **18**, 1009-1014 (1997.)
 49. H. Van Furth, P.H. Nibbering, J.T. Van Dissel, and M.M.C. Diesselhoff-den Dulk, "The characterization, origin, and kinetics of skin macrophages during inflammation," *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 398-402 (1985.)

Chapitre 5. Résultats des études de la biodégradation

Ce chapitre constitue le deuxième article «Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media» soumis au «Journal of Biomedical Materials Research. Applied Biomaterials».

Les substances médicamenteuses, administrées par voie orale, sont sujettes à une dégradation rapide au niveau de l'estomac; ce qui va empêcher l'accomplissement de son rôle. Les polymères biodégradables sont utilisés pour l'encapsulation des drogues afin de les protéger de la destruction et de les délivrer progressivement au site d'absorption.

Dans de ce chapitre, nous traitons de la biodégradation du chitosane-xanthane (complexe de chitosane et xanthane) dans des milieux physiologiques simulés représentant les fluides stomacal et intestinal (section 3.2.1.2). Cette étude est réalisée afin de déterminer le comportement du complexe en terme de cinétique de dégradation dans ces milieux et son potentiel, comme système de libération contrôlée de médicaments, dans le tract gastro-intestinal. Une étude comparative du complexe est effectuée par rapport au chitosane, non complexé au xanthane, afin de voir si le profil de dégradation du premier est amélioré par la complexation.

Le résumé de l'article, en français, figure ci-dessous. Il est suivi de l'article tel que soumis.

Des microsphères d'hydrogel d'un complexe polyélectrolyte sont préparées à partir du chitosane et du xanthane, à la suite de l'interaction entre les deux polymères polyioniques. Leur biodégradation est étudiée comparativement à celle du chitosane. Les milieux physiologiques utilisés pour la biodégradation sont le fluide gastrique simulé (FGS, pH 1.2) et le fluide intestinal simulé (FIS, pH 7.5). Le tampon phosphate salin (PBS, pH 7.4) est utilisé comme contrôle négatif. Les études ont été effectuées à 37°C, sous agitation permanente à 240 tr/min, afin de mimer les conditions physiologiques. En utilisant le glucosamine (GA) et le N-acetyl-D-glucosamine (N-Ac-GA) comme références, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est réalisée pour quantifier les produits de dégradation du chitosane. L'aire des pics est utilisée pour déterminer la quantité de chaque produit de dégradation en fonction du temps d'incubation dans les milieux. L'effet des milieux sur la structure morphologique des microsphères est évalué par microscopie électronique à balayage. Les études par HPLC ont montré que les produits majeurs de dégradation dans le FGS et le FIS sont le GA et le NAc-GA. Les 15 premiers jours ont conduit à la libération de fractions de GA alors que le NAc-GA est détecté après cette période. La cinétique de dégradation est évaluée par les produits de dégradation cumulatifs et a montré une dégradation plus rapide du chitosane par rapport au complexe. Les analyses par microscopie électronique ont montré une augmentation de la porosité des microsphères dans le FGS et le FIS, en fonction du temps d'incubation dans les milieux. Les résultats obtenus suggèrent un meilleur contrôle de la cinétique de dégradation quand le chitosane est complexé au xanthane.

Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media

Fatiha Chellat¹, Maryam Tabrizian¹, Severian Dumitriu², Esteban Chornet², Charles-Hilaire Rivard³, and L'Hocine Yahia¹

¹ Biomedical Engineering Institute, Biomechanics and Biomaterials Research Group.
Ecole Polytechnique, Montreal, Quebec, H3C 3A7, Canada

² Department of Chemical Engineering, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec,
J1K 2R1, Canada

³ Research center, Sainte-Justine Hospital, Montreal, Quebec, Canada

Corresponding author:

Maryam Tabrizian

Address: Ecole Polytechnique of Montreal
Biomedical Engineering Institute
P. O. Box 6079, Station Down Town
Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

Phone: (514) 340-4183

Fax: (514) 340-4611

e.mail: tabrizia@grbb.polymtl.ca

5.1 Abstract

Microspheres of a polyelectrolyte complex hydrogel were prepared from chitosan and xanthan after interaction between the two polyionic polymers. Their biodegradation was studied versus chitosan. Simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and intestinal fluid (SIF, pH 7.5) both as biodegradation media and phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) as a negative control were used. The degradation studies were performed at 37°C at 240 rpm permanent stirring to mimic the physiologic conditions. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was carried out to quantify the chitosan degradation products using oligochitosan and N-acetyl-D-glucosamine as references. The peaks area integration method was used to determine the amount of each degradation product as a function of incubation time in the media. The effect of the media on the morphological structure of the microspheres was assessed by scanning electron microscopy. From HPLC studies, it appeared that in SGF and SIF the major degradation products were glucosamine (GA) and N-acetyl-D-glucosamine (NAc-GA). In the first 15 days, oligochitosan fractions were released from the complex whereas N-acetyl-D-glucosamine was detected in the media after this period. The degradation kinetics were assessed by the measurement of the cumulative degradation products which showed faster degradation of chitosan than the complex in SGF and SIF. SEM micrographs showed an enhancement of microspheres porosity as a function of incubation time in the simulated physiological

media. Our results suggest a better control of the degradation kinetics when chitosan is complexed to xanthan.

KEYWORDS: Hydrogels, microspheres, chitosan-xanthan, complex, biodegradation, Simulated physiological media, HPLC.

5.2 Introduction

Polymers are among the most widely used materials in pharmaceutical sciences especially biodegradable polymers which received an increased attention in the last decades as drug delivery systems. These materials have the considerable advantage of their clearance from the body after the release of therapeutic agents. Such materials include synthetic, semisynthetic and natural polymers such as peptides and polysaccharides. The latter are known for their natural availability, ease of use, low costs and biocompatibility. Chitosan (CH) and xanthan (X) are among the natural polymers which have been extensively studied as drug delivery systems.

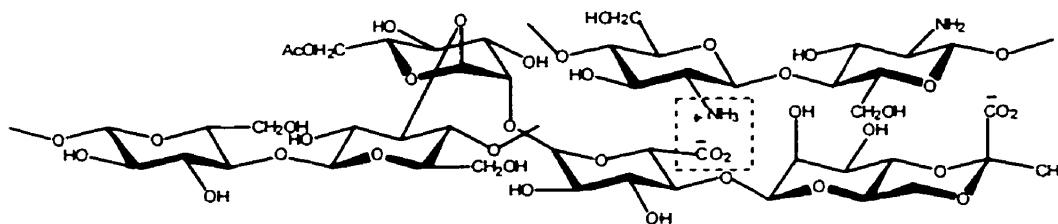


Figure 5.1 Schematic representation of Chitosan and Xanthan interaction to form the CH-X hydrogel.

In this paper, we focused on Chitosan-Xanthan (CH-X) microspheres hydrogel-based obtained after chitosan and xanthan complexation (figure 5.1).

Chitosan [(1 → 4) -2-amino-2-deoxy-β-D-glucan] is a polymer of Glucosamine (GA) and *N*-Acetyl-Glucosamine (NAG) residues. It is prepared after alkaline *N*-deacetylation of chitin. The Chitosan possesses reactive functionalities represented by the amino groups, it is easily degraded by enzymes and the degradation products are non-toxic¹. Its polycationic properties allowed its use for the preparation of various polyelectrolyte complex products with natural polyanions as carboxymethylcellulose², alginic acid³, dextran sulfate⁴, carboxymethyldextran⁵, heparin⁶, carragenan and pectin⁷. In presence of xanthan gum, another polysaccharide having polyanionic properties provided by carboxylic groups, it forms water insoluble hydrogel. Xanthan have already been used as a support material for enzyme and cell immobilization⁸⁻¹⁰. Many systems have been developed using cross-linking agents which could lead to toxic reactions. Glutaraldehyde is among the agents used for chitosan cross-linking to control the kinetics of drug

release^{11,12}. Chitosan-Xanthan complex (CH-X) is developed without any cross-linking agent, by simple interaction between chitosan and xanthan polysaccharides. Polyionic hydrogels, formed through interaction of a polyanion (xanthan) with a polycation (chitosan) have the advantage of creating an ionic microsystem which favors the stabilization of proteins and other therapeutic agents by interacting with the free acid and base functions. In a previous work, we reported on an increase in thermal stability and enzyme activity after immobilization in CH-X hydrogel¹³. Similar observations were pointed out on fumarase activity after *Corynebacterium glutamicum* cell immobilization by Chu et al.¹⁴.

In oral drug delivery systems, the major encountered problem is the quick denaturation of therapeutic agents in the hostile environment of the stomach. Since oral drug administration remains the easiest and the most comfortable method, the microencapsulation of drugs is an alternative solution to overcome the problem allowing their slow release and protection against the acidic and enzymatic gastric environment. Based on our previous findings, we studied the CH-X microspheres as a potential candidate for the controlled and sustained drug delivery via gastrointestinal tract. Since drug release is affected by the pattern and the rate of hydrogel degradation¹⁵, the purpose of this study deals with one aspect of drug delivery based on the biodegradation rates of CH-X microspheres and their structural changes when exposed to gastric and intestinal fluids.

Various factors can influence the degradation and the drug and active agents release. Among them we can list the chitosan molecular weight, degree of deacetylation and pH

solution as well as the initial chitosan and xanthan concentration. The hydrogel as polyelectrolytes complexes is pH-sensitive swelling. The pH-sensitivity allows their potential for use as drug delivery systems particularly in oral administration¹⁶. In a previous study, CH-X hydrogel was found to exhibit different swelling behavior by modifying the listed parameters. The swelling capacities have been shown to increase with a decrease in pH, while they decreased with the higher degree of acetylation¹⁷.

The lower degree of acetylation seems to allow more ionic linkages resulting in a denser gel capable of inserting higher amounts of water via hydrogen bonding. The higher swelling capacities allows the hydrogel to be a good candidate for drug release¹⁸. Using a poly (hydroxyethyl methacrylate-CO-methacrylic acid) hydrogels, Kou et al., reported on that the swelling accelerates the drug release process and increases the diffusional mobility of drug molecules in the matrix as a result of swelling¹⁹. Based on these findings, we used chitosan having a degree of acetylation of 12% for the complexation with xanthan. The resulting hydrogel had a large swelling capacity which avoid its disintegration when prepared as microspheres. This was confirmed by a study using xanthan-carboxymethylcellulose complex²⁰.

Here, we report on Chitosan-Xanthan microspheres degradation behavior in simulated physiologic fluids such as simulated gastric and intestinal fluid in accordance with USP XXII²¹. We used PBS as a negative control since it has a neutral pH and contained no enzymes. The degradation kinetics determined by HPLC is reported as a function of incubation time in the media. A comparison is performed between degradation kinetics of

CH-X complex and chitosan alone. SEM analyses were performed to determine the influence of the different media on the morphology and the structure of the microspheres.

5.3 Materials

Xanthan with a molecular weight of 300 000 (Nutrasweet-Kelco, San Diego, CA, USA) and chitosan with a molecular weight of 150 000 and a degree of acetylation of 12 % (Kemestrie Inc. Sherbrooke, Canada) were employed to obtain chitosan-xanthan complex microspheres. A chitosan with a molecular weight of 200000 and a degree of acetylation of 25% (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA) was used as a control.

Preparation of chitosan-xanthan microspheres

6.5 g of chitosan were dissolved in 250 ml of HCl 1N. The solution was stirred for 1 hour and 200 ml of deionized distilled (DD) water were added. After complete dissolution of chitosan, more water was added to make 900 ml, the solution was neutralized with NaOH to reach a pH 5.7 and the volume adjusted to 1 liter.

Xanthan solution was obtained by dissolving 6.5 g of xanthan in 1 liter of deionized distilled water and then added through N° 20 hypodermic needle under constant pressure to chitosan solution under stirring to obtain complex microspheres. After filtration,

several times washing with acetate buffer (6.5 ml of glacial acetic acid and 38.3g of sodium acetate in 1 liter of water), and DD water, microspheres were freeze-dried.

Preparation of degradation media

Simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) were prepared in accordance with USP XXII²¹. The SGF was prepared by dissolving 2g of sodium chloride and 3.2 g of pepsin (Sigma, Oakville, ON, Canada) in 7 ml hydrochloric acid and volume was adjusted to 1 liter by water. The pH of the solution is about 1.2. The SIF was prepared by dissolving 6.8 g of monobasic potassium phosphate in 250 ml of water. The solution was mixed and 190 ml of 0.2 N sodium hydroxide and 400 ml of water and 10 g of pancreatin (Sigma) were added. The pH was then adjusted with 0.2 N sodium hydroxide to 7.5 ± 0.1 and the volume was completed to 1 liter by water.

PBS solution was prepared by dissolving 9.6 g of Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma) in 1 liter of DD water.

Antibiotics (Pennicillin-streptomycin) and antimycotic (Fungizone) from Gibco were added to each solution to avoid bacterial contamination and growth.

5.4 Methods

Biodegradation studies

Three aliquots of each medium were prepared and 100 mg of dried microspheres were suspended in 5 ml of each medium in 15 ml plastic tubes. Samples' tubes were incubated at 37°C under continuous shaking at 240 rpm.

After a predetermined incubation time the solution was filtered through 0.45 µm Millipore nylon filter for chromatography analyses.

Scanning electron microscopy (SEM)

To determine the microspheres morphological and ultra-structural changes after incubation, SEM study was performed after the different degradation periods. For SEM studies a JOEL JSM-840A scanning electron microscope operated under an accelerated voltage of 15 or 20 kV was used. For SEM observations, incubated microspheres were washed three times with DD water and stabilized with 3% glutaraldehyde solution in a 0.1 M phosphate buffer at 4°C for 60 minutes. The microspheres were then rinsed several times with the 0.1M phosphate buffer solution and post-fixed in 1% Osmium Tetroxide (OsO₄) in a 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2 for 24 hours at 4°C. After rinsing, the microspheres were dehydrated sequentially with increasing ethanol solutions concentrations (30, 50, 70, 90, 95 and 100 vol%).

The ethanol impregnated gel samples were totally dried by the critical point drying method (CDP) using CO₂. The dried samples were fixed on aluminum sample holders

using a silver-based adhesive and then coated by a conductive layer (15 nm) of Au/Pd (sputtering method, Anatech Ltd., Model Hummer VI).

HPLC-UV analyses

These studies were performed using Waters instrument (model 410) equipped with a tunable UV-visible absorbance detector (Waters, 486), and a solvent pump (Waters, 510). Sample injector is fitted with 250 μ l stainless-steel injection loop (U6K). A Supelcosil LC-18 (30 cm x 4.0 mm ID) (Supelco, Bellefonte, PA) was used in series with an RCM 8 x 10 module (Waters, Milford, Massachusetts). The mobile phase was HPLC-grade water at ambient temperature with a flow-rate of 0.7 ml/min.

HPLC analyses were performed after 1, 7, 15 and 30 days by the measurement of degradation products peaks area using glucosamine and N-acetylglucosamine as references.

5.5 Results

Assessment of CH and CH-X microspheres degradation using HPLC

CH and CH-X degradation are shown in figures 5.2-5.4 as assessed by GA and NAc-GA peaks areas measurement

Figure 5.2 shows the faster degradation of CH in comparison to the chitosan complexed with the xanthan (CH-X). CH and CH-X degradation begins after 1 day of incubation in

SGF. For CH the maximum of GA formation is achieved after 7 days and follows a relatively constant rate until 15 days. Whereas CH-X reached the maximum GA release only after 15 days. After this period the amount of GA dropped sharply for both CH and CH-X. The difference in the degradation rate after 7 days between CH and CH-X in SGF is shown in figure 5.3 as assessed by GA peak.

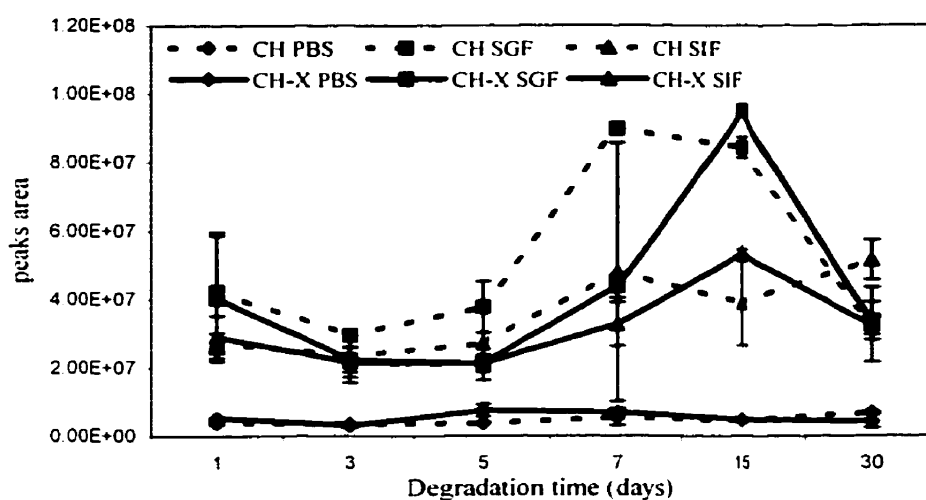


Figure 5.2 GA production by CH and CH-X as a function of degradation time

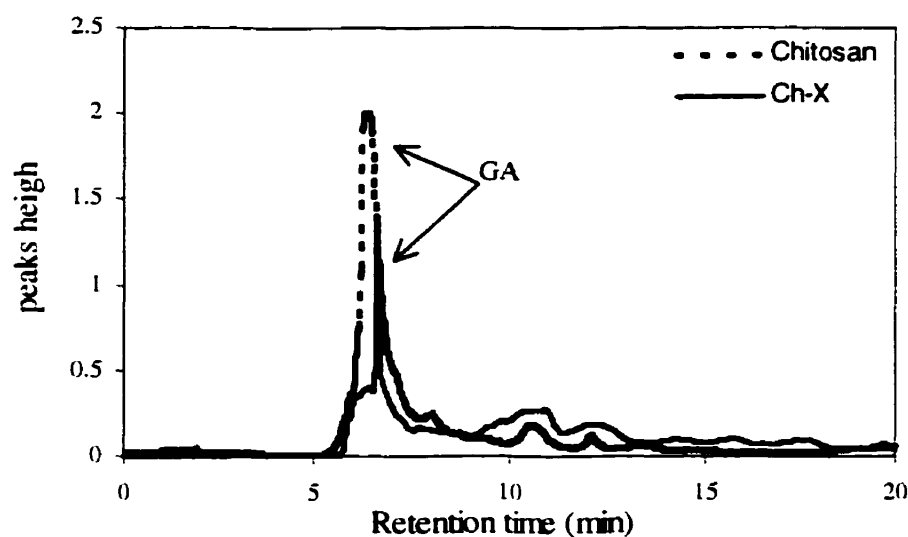


Figure 5.3 HPLC chromatograph of CH and CH-X after 7 days degradation in SGF

After 15 days, the main degradation product is NAc-GA in the case of CH. A higher amount of this product is released from CH in both SGF and SIF whereas its formation is lower in CH-X complex (fig. 5.4). HPLC chromatograph shows the difference in NAc-GA release from CH versus CH-X in SIF (fig. 5.5).

Both CH and CH-X showed a faster degradation in SGF in comparison to SIF (fig. 5.6 and fig. 5.7). In SIF, the degradation is slower than in SGF as shown by peak areas. In the case of CH, a preferential release of NAc-GA is shown in SIF while CH-X showed identical degradation products in SGF and SIF.

In PBS, a very low degradation is shown for both samples (fig. 5.2, 5.4, and 5.7).

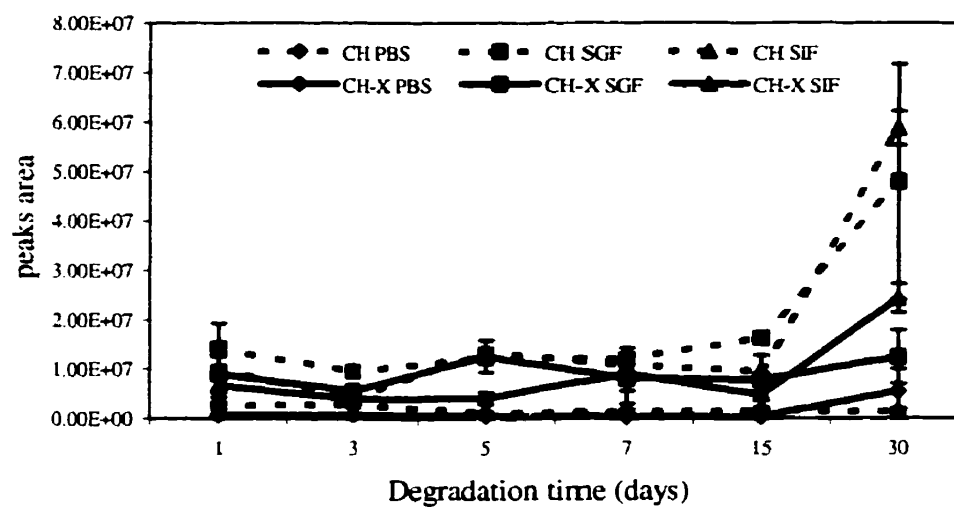


Figure 5.4 NAc-GA production by CH and CH-X as a function of degradation time

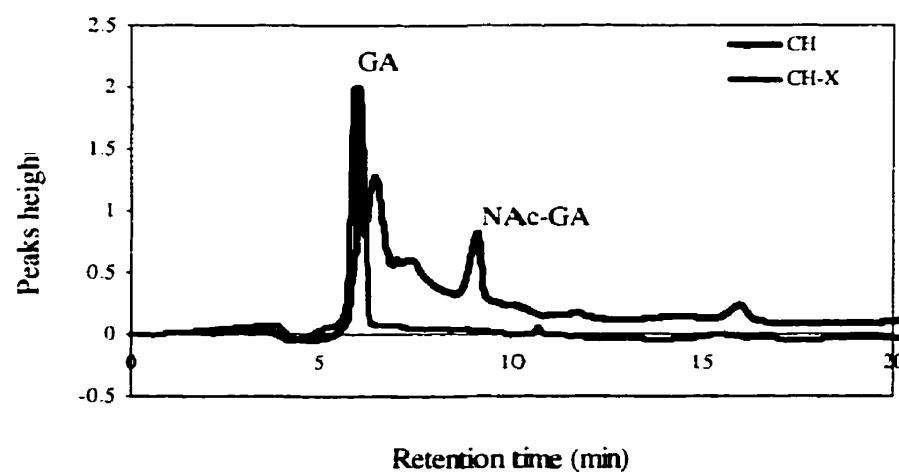


Figure 5.5 HPLC chromatograph of CH and CH-X after 7 days degradation in SIF

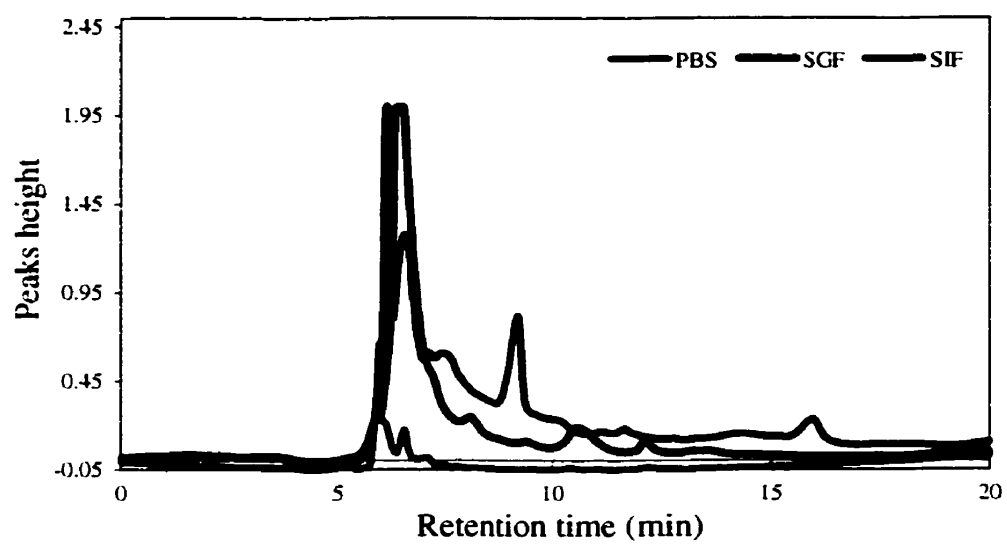


Figure 5.6 CH HPLC chromatograph after 7 days degradation in different media

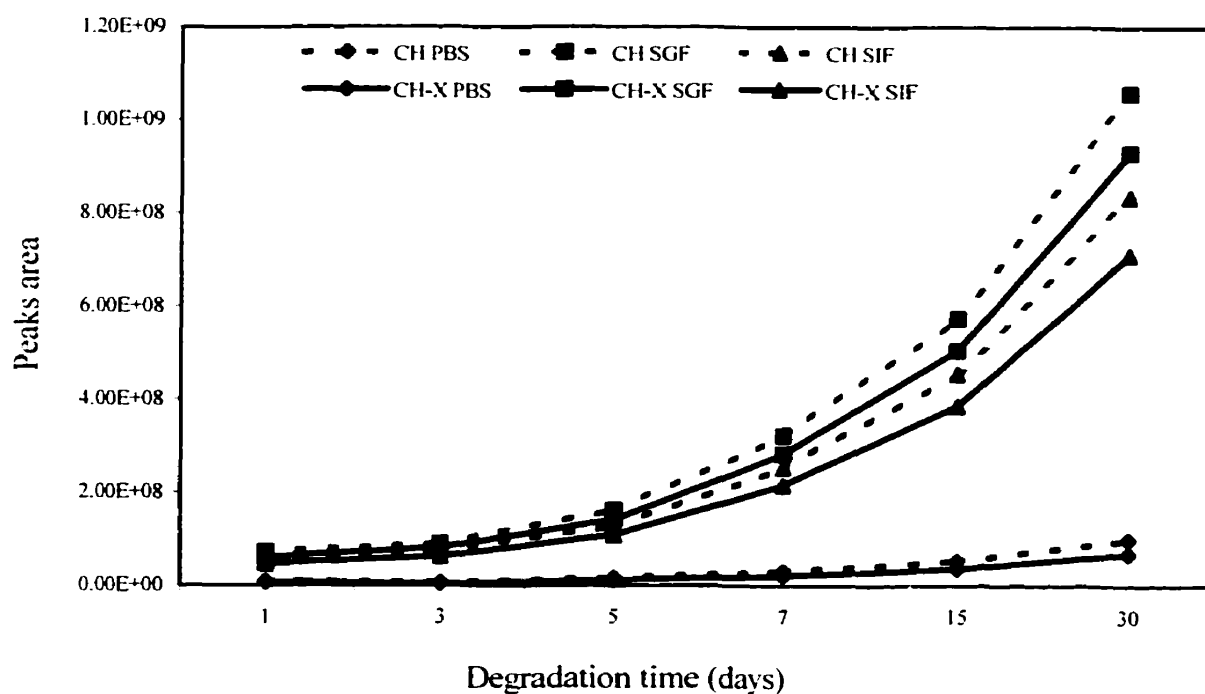


Figure 5.7 CH and CH-X microspheres cumulative degradation products

SEM analyses

SEM analyses of CH-X microspheres showed an internal and external fibrillar structure. The fibrils diameter is about 50 nm. After the incubation of the complex in SGF and SIF, a modification is observed in the external aspect of the microspheres. The surface morphology showed an augmentation in the pores diameter as a function of incubation time in SGF (fig. 5.9-5.11). The changes were more evident for the internal structure where the fibrils diameter decreased from 50 nm to 10 nm in SIF. The later led to a dissociation of the fibrils which were associated in the primary structure (fig.5.12).

Microspheres incubation in PBS showed a little porous structure attesting on the integrity preservation and a very low degradation (fig. 5.8).



Figure 5.8 CH-X particles after 7 days incubation in PBS

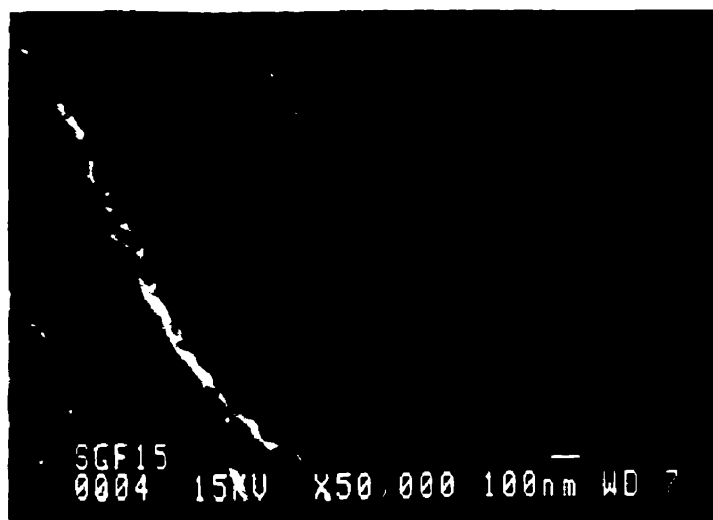


Figure 5.9 CH-X particles after 15 days incubation in SGF



Figure 5.10 CH-X particles after 1 day incubation in SGF

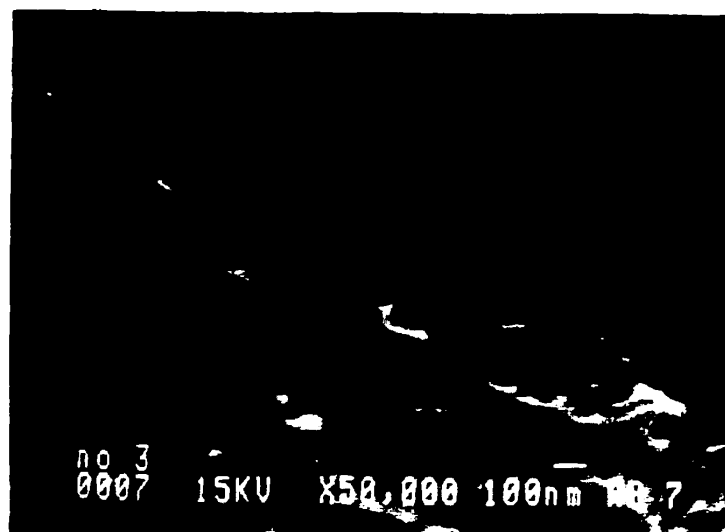


Figure 5.11 CH-X particles after 7 days incubation in SGF.

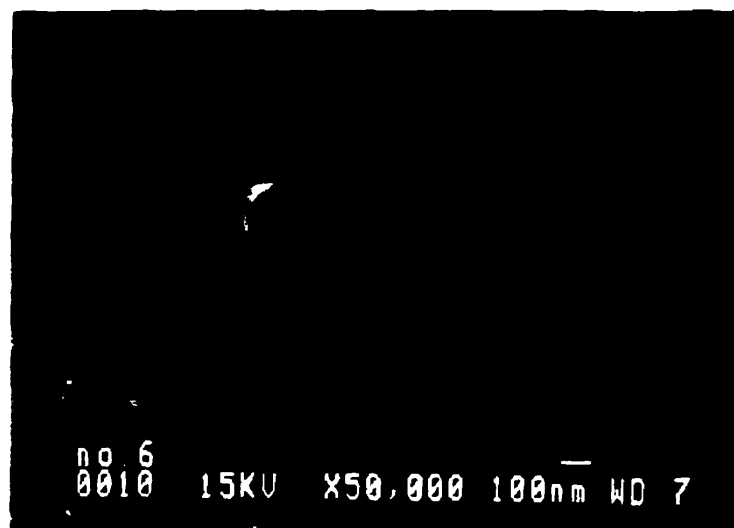


Figure 5.12 CH-X particles after 15 days incubation in SIF

5.6 Discussion

Polymer degradation is the chain scission process that breaks polymer chains down to oligomers and into monomers. The term “biodegradable” is used for materials, where degradation is mediated by a biological system²². In this study we focused on the degradation of CH-X microspheres in comparison to CH by the assessment of known degradation products of the CH, i.e. GA and NAc- GA. The results showed that the degradation occurred in 2 steps leading, in the first one to the formation of GA oligomers and to NAc-GA in the second one. The former were found to be released from CH and CH-X at the beginning of the degradation to reach a maximum at day 7 post degradation

in the case of CH and at day 15 for the complex (fig. 5.2). After these periods, the drop in their amount could be explained by the fact that the GA oligosaccharides undergo a second degradation with a concomitant release of NAc-GA which increased, as a function of time, from 15 and 30 days (fig. 5.4). NAc-GA was detected after 7 days for the CH degraded in SIF whereas it occurred after this period for CH-X (fig. 5.5). This suggest a different degradation way for the polymer depending on the environmental pH.

GA and NAc-GA formation is dependant on the time and media incubation. The former is firstly released probably because of the availability of free amino groups distributed randomly on the chitosan chain. After complexation with the xanthan, supramolecular conformational changes occur in chitosan. These changes make the sensitive liaisons less accessible to the hydrolytic action of the media. Since xanthan is believed to be enzymatically resistant, we expected that it could provide a protective effect against the enzymatic hydrolysis. As well, chitosan used as a model for drug delivery showed a very fast dissolution in acidic media²³. Complexation, could improve the kinetics of CH degradation due to the stability of X at wide ranges of pH²⁴ in contrast to other gums possessing carboxyl acid function which are greatly influenced by the pH. This property is conferred by the rod shape of the molecule and the importance of hydrogen bonding intermolecularly²⁵. In SGF, chitosan led to the formation of more GA in comparison to the complex as shown by HPLC chromatograph (fig. 5.3).

In PBS there was almost no degradation of CH neither CH-X complex. Similar noting was made by Chandy and Sharma who observed a higher release amount of ampicillin

from chitosan microbeads in HCl buffer (pH 2.0) compared to phosphate buffer (pH 7.4)²⁶.

Another emerging point is that GA is preferentially released in SGF in comparison to SIF (fig. 5.2) whereas NAc-GA fractions were greatly present in SIF. However, CH showed more release of NAc-GA in both media in comparison to CH-X (fig. 5.4). This indicated the influence of the pH solution on the degradation rate of the hydrogels as well as on the fractions released.

The comparative effects of each medium on the CH and CH-X degradation allowed us to observe that: 1)- in PBS, a very low degradation rate occurred for both CH and CH-X (fig. 5.6 and fig. 5.7); 2)- the degradation pattern of CH is different in SGF and SIF (fig. 5.6); 3)- in SGF and SIF, the complex degradation products seemed to be identical with a slight augmentation of their concentration in SGF.

The cumulative degradation products of CH versus CH-X are represented in figure 5.7 where SGF seems to accelerate the degradation of both CH and CH-X in comparison to SIF. A previous study by Yomota et al., reported on a preferential degradation of chitosan in acidic conditions²⁷. Otherwise, CH alone seemed to be more sensitive in SGF and SIF than CH-X complex. However the degradation kinetics follows the same way for CH and CH-X however the medium used.

SEM analyses confirmed the degradation of the microspheres in SGF and SIF in comparison to PBS (fig. 5.8- 5.12). As a sign of degradation, the porosity increased, with incubation time in SGF (fig. 5.9-5.11). In SIF, the fibrils seemed to be dissociated

attesting of the relaxation of the hydrogel (fig. 5.12). Based on these findings, one could suggest that the mechanism of degradation in SGF and SIF occurred differently.

Drug delivery systems based on biodegradable matrices could be controlled by chemical, diffusion and swelling factors²⁸. The last one is of great importance since the drug release is dependant on the swelling of the matrix. In response to changes in environmental variables such as temperature, pH and ionic strength, the swelling properties are affected which in turn could influence the matrix biodegradation and the drug release phenomenon^{29,30}.

The CH-X swelling capacities at pH varying from 3.6 to 8 were studied by Dumitriu et al.¹⁷, and reported that they increased with a decrease in pH environment. In our study, we demonstrated a faster degradation in low pH medium which could be related to the higher swelling of the microspheres³¹.

5.7 Conclusion

CH-X provide a protective effect against CH degradation in both simulated gastric and intestinal fluids. The degradation started from the first day and was maintained almost constant until the fifth day. After this, the gels followed an accelerated degradation rate leading to the complete disintegration of the microspheres after 30 days. Hence, CH-X microspheres could have a potential use as a drug delivery system in the gastric-intestinal

tract. In addition, CH-X complex led to non-toxic normal metabolites (GA and NAc-GA) after its degradation.

In PBS the degradation of the complex microspheres and chitosan was found to be very low which represented a good control in our model. In all the media, chitosan degraded faster than the complex. These results indicate that the complexation led to a better control of the degradation rate giving an additional controlled release characteristics to the complex when used as a drug carrier. This characteristic was allowed by the ionic interactions between the amine groups of CH and the carboxyl groups of X, which provided the system with a new element for controlling the biodegradation.

The degradation kinetics is dependant on the swelling and structural properties of the polymers used in the complex fabrication. This gives rise to new approaches which could be considered to develop new systems based on modified CH properties to control the degradation profiles in specific media. Finally, the pH sensitivity of the hydrogel and the protective effect of xanthan in gastric and intestinal environment makes it more suitable for oral delivery as a biomaterial with specific degradability and pH-dependant release.

5.8 References

1. R.A.A. Muzzarelli, "Chitin," Pergamon Press, Oxford, 1977, p.259.
2. H. Fukuda, "polyelectrolyte complexes of chitosan with sodium carboxymethylcellulose," *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **53**, 837-840 (1980.)
3. D. Knorr, and M. Daly, "Mechanics and diffusional changes observed in

- multilayer chitosan/alginate coacervate capsules," *Progress Biochem.*, **48**, 48-50 (1988.)
4. Y. Kikuchi, and H. Fukuda, "Polyelectrolyte complexes of sodium dextran sulfate with chitosan," *Makromol. Chem.*, **175**, 3593-3596 (1974.)
 5. H. Fukuda, and Y. Kikuchi, "Polyelectrolyte complexes of chitosan with carboxymethyldextran," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 1142-1144 (1978.)
 6. Y. Kikuchi, and A. Noda, "Polyelectrolyte complexes of heparin with chitosan," *J. Appl. Polym. Sci.*, **20**, 2561-2563 (1976.)
 7. C. Mireles, M. Martino, J. Bouzas, and J.A. Torres, "Complex formation of chitosan and naturally occurring polyanions," in *Chitin and Chitosan*, C.J. Brine, P.A. Sandford, J.P. Zikakis (ed.), Elsevier Appl. Sci., London, 1992, pp. 506-515.
 8. S. Dumitriu, and E. Chornet, "Immobilization of xylanase in chitosan-xanthan hydrogels," *Biotechnology Progress*, **13**, 539-545 (1997.)
 9. S. Dumitriu, E. Chornet, and C. Moresoli, "Polyionic hydrogels as support for immobilization of lipase," *Biotechnology techniques*, **9**, 833-836 (1995.)
 10. C.-H. Chu, H. Kumagai, and K. Nakamura, "Application of polyelectrolyte complex gel composed of xanthan and chitosan to the immobilization of *Corynebacterium glutamicum*," *Journal of applied Polymer Science*, **60**, 1041-1047 (1996.)
 11. S.R. Jameela, and A. Jayakrishnan, "Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the *in vitro* release of mitoxantrone and *in vivo* degradation of microspheres in rat

- muscle." *Biomaterials*, **16**, 769-775 (1995.)
12. B.C. Thanoo, M.C. Sunny, and A. Jayakrishnan, "Cross-linked chitosan microspheres : preparation and evaluation as a matrix for controlled release of pharmaceuticals," *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**: 283-286 (1992.)
 13. S. Dumitriu, and E. Chornet. "Polyionic hydrogels as supports for enzyme immobilization," in *Chitin Enzymology*, R.A.A. Muzzarelli (ed.), Atec Edizioni, 1996, pp. 527-541.
 14. C.-H. Chu, H. Kumagai, and K. Nakamura, "Application of polyelectrolyte complex gel composed of xanthan and chitosan to the immobilization of *Corynebacterium glutamicum*," *J. Applied Polymer Science*, **60**, 1041-1047 (1996.)
 15. K. Park, W.S.W Shalaby, and H. Park. "Biodegradable hydrogels for drug delivery," Technomic, Lancaster, PA, 1993, pp. 189-232.
 16. P. Ravichandran, K. L. Shantha, and K. P. Rao. "Preparation, swelling characteristics and evaluation of hydrogels for stomach specific drug delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, **154**, 89-94 (1997.)
 17. S. Dumitriu, P. Magny, D. Montané, P. F. Vidal, and E. Chornet. "Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan: Their properties as supports for enzyme immobilization," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **9**, 184-209 (1994.)
 18. J.P. Montheard, M. Chatzopoulos, and D. Chappard. "2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA): Chemical properties and applications in biomedical

- fields." *J.M.S. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **32**, 1-34 (1992.)
19. J.H. Kou, G.L. Amidon, and P.I. Lee, "pH-dependent swelling and solute diffusion characteristics of poly (hydroxyethyl methacrylate-CO-methacrylic acid) hydrogels." *Pharm. Res.*, **5**, 592-597 (1988.)
 20. T. Shioya, C. K. Rha, and S. Brand, "Transmembrane permeability of chitosan/carboxymethyl cellulose capsule." in *Chitin and Chitosan*, I. G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sanford (Eds), Elsevier Appl. Sci., London, New York, 1989, pp. 627-634.
 21. Biological evaluation of medical devices_Part 9: Degradation of materials related to biological testing. In *Association for the Advancement of Medical Instrumentation*. Technical Information Report No. 10993, 141-221. (1995.)
 22. M. Vert, J. Feijen, A. Albertson, G. Scott, E. Chiellini, "Degradable polymers and plastics." Redwood Press Ltd., UK, 1992, pp. 73-92.
 23. M.L. Lorenzo-Lamosa, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, " Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery, " *J. Control. Release*, **52**, 109-118, (1998.)
 24. M. Talukdar, and J. Plaizier-Vercammen. "Evaluation of xanthan gum as a hydrophilic matrix for controlled-release dosage form preparations." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **19**, 1037-1046, (1993.)
 25. I.W. Cottrell, K.S. Kang, and P. Kovaes, in "Handbook of water soluble gums and resins" L.Davidson eds., McGraw -Hill, Inc., 1980, Chapter 24, pp. 1.
 26. T. Chandy, and C.P. Sharma, "Chitosan matrix for oral sustained delivery of

- ampicillin." *Biomaterials*, **14**, 939-944 (1993.)
27. C. Yomota, T. Komuro, and T. Kimura, "Studies on the degradation of chitosan films by lysozyme and release of loaded chemicals," *Yakugazu-Zasshi*, **110**, 442-448 (1990.)
 28. R.J. Linhardt, "Biodegradable polymers for controlled release of drugs," in *Controlled release of drugs : Polymers and Aggregate Systems*, M. Rosoff (ed.), VCH publishers, New York, 1989, pp. 53-95.
 29. H.Y. Park, C.R. Choi, J.H. Kim, W.S. Kim, "Effect of pH on drug release from polysaccharide tablet, " *Drug Deliv.*, **5**, 13-18 (1998.)
 30. N.A. Peppas, J. Klier, "Controlled release by using poly(methacrylic acid-g-ethyleneglycol) hydrogels. " *J. Control. Release*, **16**, 203-214 (1991.)
 31. H. Brondsted, J. Kopecek, "Hydrogels for site-specific drug delivery to the colon: in vitro and in vivo degradation, " *Pharm. Res.*, **9**, 1540-1545 (1992.)

Chapitre 6. Résultats de l'étude de la stérilisation (non publiés)

L'un des problèmes rencontré pour la stérilisation des matériaux biodégradables est leur sensibilité à la chaleur et à l'humidité. De ce fait, des techniques alternatives sont utilisés pour palier à ce problème. Cependant, ces dernières ne sont pas exemptes de conséquences néfastes et doivent être utilisées avec précaution. Des études sur le comportement de ces matériaux, à la suite de la stérilisation par une technique donnée sont donc nécessaires.

Deux aspects doivent être pris en compte : la préservation des caractères désirés du matériau ainsi que l'absence ou la minimisation de conséquences sur l'organisme ou l'organe hôte.

Les techniques les plus couramment utilisées pour la stérilisation des dispositifs à base de polymères sont la chaleur (sèche et humide), l'irradiation et l'oxyde d'éthylène. À date, aucune donnée n'est disponible faisant cas de la stérilisation du complexe chitosane-xanthane. Cependant quelques études ont porté sur la stérilisation des polymères, au sens large. Certains effets peuvent s'appliquer également au chitosane et au xanthane à cause de leur nature polysaccharidique. Dans le cas du complexe, il est plus difficile d'extrapoler vu sa structure mettant en jeu des liaisons par interactions ioniques.

Nous exposons ici quelques études puisées de la littérature sur les effets de la stérilisation sur les propriétés physico-chimiques du chitosane et du xanthane. Il sera essentiellement

question des techniques de stérilisation par la chaleur et par irradiation. Les effets de la stérilisation par oxyde d'éthylène, faisant souvent l'objet d'études du point de vue biocompatibilité, nous ne disposons pas de données concernant les effets sur les caractéristiques physico-chimiques du chitosane et du xanthane.

Des changements dans les propriétés physico-chimiques des polymères sont observés après irradiation. Les deux mécanismes majoritairement provoqués sont:

- La scission des chaînes polymériques qui conduit à la réduction du poids moléculaire et la viscosité du polymère;
- La réticulation qui conduit à la formation de larges réseaux tridimensionnels (Skiens, 1980).

Les conditions utilisées lors de la stérilisation par irradiation provoquent la formation de radicaux libres qui se transforment en radicaux peroxydes dépendants de paramètres tels que la température, la dose totale, le taux de l'irradiation et la taille des échantillons (Skiens, 1980).

L'irradiation gamma du chitosane conduit à une altération de ses propriétés physico-chimiques. Une diminution dramatique de sa viscosité est constatée en se basant sur le poids moléculaire du polymère qui décroît avec l'augmentation de la dose d'irradiation. De même, la structure du réseau se voit perturbée (Lim et al., 1998) ainsi que les propriétés mécaniques qui diminuent (Berthod et al., 1994). Ceci est expliqué par la scission de chaînes du polymère et la baisse de sa température de transition vitreuse.

Les propriétés physico-chimiques du chitosane sont aussi altérées par la stérilisation à la chaleur. Sa dégradation est provoquée par ce traitement lorsqu'il est en solution (Zahraoui et al. 1999). Sous forme de membranes, il devient moins soluble (Lim et Wan, 1995). Ce qui fût expliqué, après analyses thermiques et NMR, par le fait que le chitosane se transforme en chitine insoluble dans l'eau (Toffey et al., 1996).

Après autoclavage, une diminution de l'hydrophilicité des films de chitosane est observée (Rao et Sharma, 1995). Cette réduction pourrait être liée à la formation de cristaux polymorphes anhydres observés dans le chitosane chauffé en présence d'eau (Ogawa, 1991).

La viscosité du chitosane augmente proportionnellement au traitement thermique et à la saturation de l'atmosphère en humidité. À des températures élevées, la chaleur sèche conduit à la formation de chromophores qui pourraient être reliés à la réticulation interchaînes impliquant les groupements NH_2 . En fait, des réarrangements de chaînes et une faible affinité pour l'eau, après exposition à la chaleur sèche ou saturée de vapeur, ont été observés (Lim et al., 1999).

Le xanthane fait partie des polymères souvent utilisés comme agents de support, de liants et stabilisants dans les formulations solides, gels et suspensions. L'irradiation conduit à leur décomposition de façon dose-dépendante et se traduit par des coupures aléatoires dans la chaîne principale. Il en résulte alors une baisse immédiate et sévère dans leur viscosité (Rasero et Skauen, 1967).

Le traitement par irradiation induit des coupures au niveau des liens glucosidiques des gommes végétales conduisant à la formation de radicaux libres stables (Antoni, 1973). Concernant le xanthane, il a montré une baisse dramatique de viscosité après irradiation due à la réduction dans le degré de polymérisation.

Le xanthane est affecté après traitement par la chaleur. Stokke et ses collaborateurs (1989) ont reporté que la chaîne de xanthane est clivée; ce qui résulte dans la diminution de la viscosité. De même, une baisse du contenu en carbohydrates, attestée par la baisse du ratio mannose/glucose, est notée après incubation à une température de 80°C. Cette perte croît avec l'augmentation de la température.

La méthode la plus utilisée pour la stérilisation des gommes est l'autoclavage. Mais il a été aussi démontré qu'elle provoque la dégradation des polymères de même que la chaleur sèche (Leo et al., 1990).

L'étude des effets de la stérilisation sur les complexes de chitosane-xanthane est d'une importance capitale. Ayant un potentiel comme système de relargage contrôlé de médicaments, une altération dans les propriétés des polymères peut avoir un impact sur leur usage dans ce domaine.

Ainsi, la stérilisation gamma peut affecter la performance du système de relargage de médicaments. Premièrement: la dégradation radiolytique de la substance active pourrait conduire à la libération de substances toxiques. De cette façon, le contenu de drogue est diminué. Deuxièmement: la dégradation du polymère peut affecter la libération de

médicament et sa résorption *in vivo* : ce qui est le cas du chitosane (Gosk et al., 1992; Volland et al., 1994).

Alleman et al. (1993), ont montré qu'après irradiation de nanosphères polymériques, à base d'acide polylactique, une diminution de leur poids moléculaire est observée. Ce qui a conduit à une altération du taux de relargage de médicament. Des résultats similaires sont observés par Bawa et Nandu (1990) après traitement par la chaleur.

À la lumière des résultats de la littérature et des expériences préliminaires conduites en laboratoire, nous avons étudié les effets de la stérilisation par oxyde d'éthylène et par le système Sterrad[®] (section 3.3.1.2) comme méthodes alternatives. Ce chapitre présente les résultats obtenus concernant l'effet des deux techniques sur les propriétés physico-chimiques des hydrogels. Les résultats sont comparés avec ceux de films de chitosane-xanthane non stérilisés. Les paramètres étudiés sont : les propriétés de gonflage, l'énergie de surface, les propriétés mécaniques, propriétés mécaniques dynamiques (DMTA : dynamic mechanical thermal analyses), ainsi que les analyses topographiques par microscopie électronique à balayage.

6.1 Propriétés de gonflage

Les capacités de gonflage nous renseignent sur le degré d'absorption d'eau par l'hydrogel. Cette propriété est d'une importance primordiale car elle joue un rôle important dans la dégradation du polymère et la cinétique de libération d'agents actifs quand celui-ci est utilisé comme véhicules médicamenteux. Plus les capacités de gonflage augmentent, plus la dégradation est importante (Brondsted et Kopecek, 1992); ce qui va influencer grandement la cinétique de libération (Kim et al., 1992).

Après stérilisation par Sterrad[®], les capacités de gonflage diminuent de moitié par rapport au contrôle. La stérilisation par oxyde d'éthylène (EtO) semble n'avoir aucun effet sur cette caractéristique (figure 6.1). Le plasma et le peroxyde d'hydrogène sont, tous deux, connus pour leur pouvoir ionisant pouvant induire des changements dans les interactions entre les groupements amine et carboxyl du complexe et produire des dissociations entre les chaînes de chitosane et de xanthane (Chu et al., 1995).

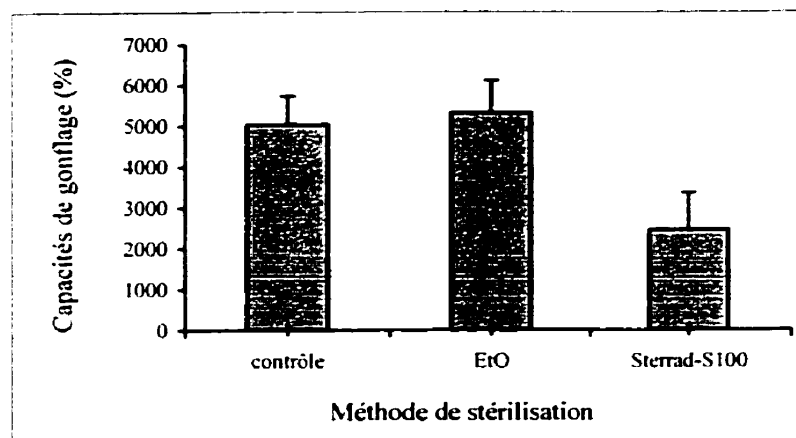


Figure 6.1 Influence de la stérilisation sur les capacités de gonflage de films de chitosane-xanthane (n = 10).

6.2 *Énergie de surface*

Ces études permettent de voir les effets de la stérilisation sur les propriétés de surface des films. La détermination des angles de contact avec l'eau peut nous renseigner sur les changements de surface des films du point de vue hydrophilicité et hydrophobicité. Ces deux propriétés peuvent avoir des conséquences concernant l'attachement de cellules à la surface des films (von Recum et al., 1998). Ces propriétés de surface ont leur importance pour une application potentielle dans le génie tissulaire (ex. traitement de brûlures).

L'attachement des cellules aux hydrogels décroît à mesure que leur hydrophilicité augmente (Smetana, 1993). Les mêmes résultats sont observés par Pringle et Fletcher (1986). De plus, ces derniers ont montré que la diminution de l'angle de contact de l'hydrogel avec l'eau conduit à une baisse de l'attachement des cellules au polymère.

Comme nous pouvons voir dans la figure 6.2, la stérilisation par oxyde d'éthylène conduit à une augmentation de l'angle de contact au niveau des films de chitosane-xanthane. Ceci est un signe de la diminution de leur hydrophilicité pouvant conduire à l'amélioration de l'attachement cellulaire. Par ailleurs, la stérilisation par Sterrad[®] semble produire peu d'effet sur les propriétés d'énergie de surface. L'aspect des gouttelettes d'eau sur la surface des films après et sans stérilisation est illustré dans la figure 6.3.

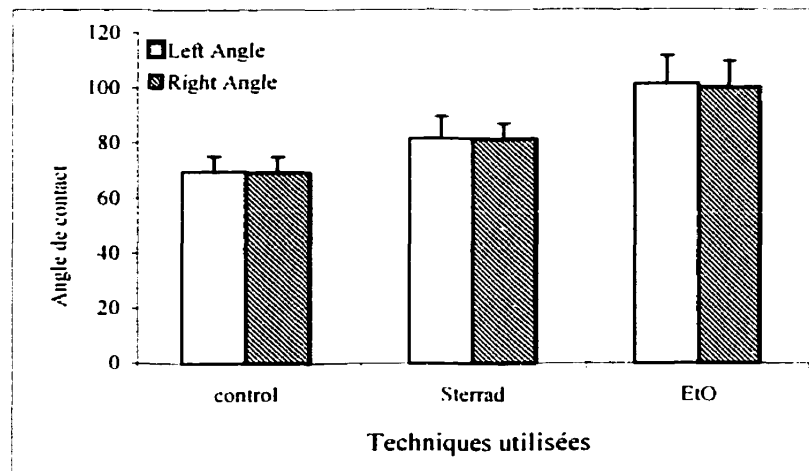
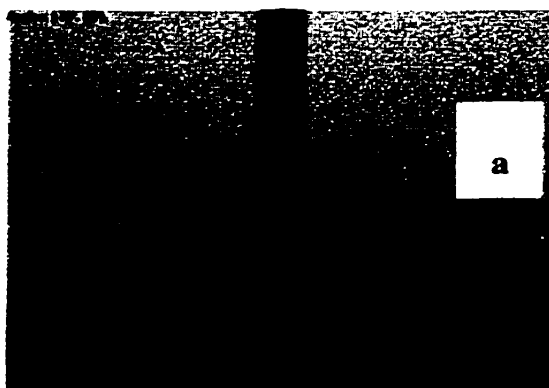
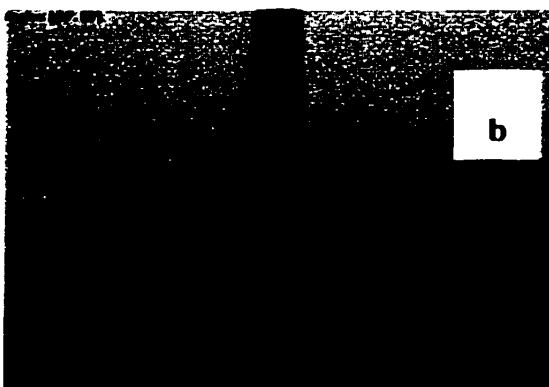


Figure 6.2 Influence des techniques de stérilisation sur l'angle de contact

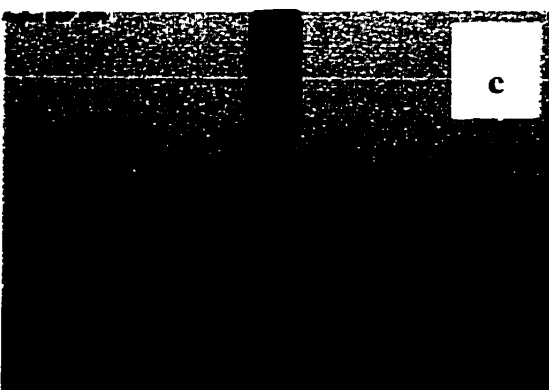
(n = 20, p = 0.028 pour Sterrad et p = 0.00078 pour l'oxyde d'éthylène)



Angles : (78°, 80°)



Angles : (84°, 86°)



Angles : (107°, 109°)

Figure 6.3 Angles de contact sur les films de Ch-X (a : contrôle; b : stérilisé par Sterrad®; c : stérilisé par oxyde d'éthylène)

6.3 Propriétés mécaniques

De par sa nature d'hydrogel, le complexe chitosane-xanthane est hautement hydrophile avec des propriétés de gonflage qui lui confèrent de très faibles propriétés mécaniques. Dans cette partie de travail, les effets de la stérilisation sont déterminés dans le but d'évaluer leur incidence sur le comportement mécanique du complexe.

Une altération de ces propriétés peut affecter d'autres propriétés telles que le degré de gonflage et plus concrètement la libération contrôlée de médicaments, utilisation pour laquelle le complexe est destiné.

La stérilisation par Sterrad[®] provoque une augmentation de l'élasticité des films alors que l'oxyde d'éthylène ne semble pas avoir d'effet (figure 6.4). Ce qui explique la diminution de la rigidité, d'une façon significative lorsque les films sont stérilisés par Sterrad[®] (figure 6.5). La charge ultime est celle à laquelle les films se cassent. Pour les deux techniques de stérilisation, sa diminution est notée (figure 6.6).

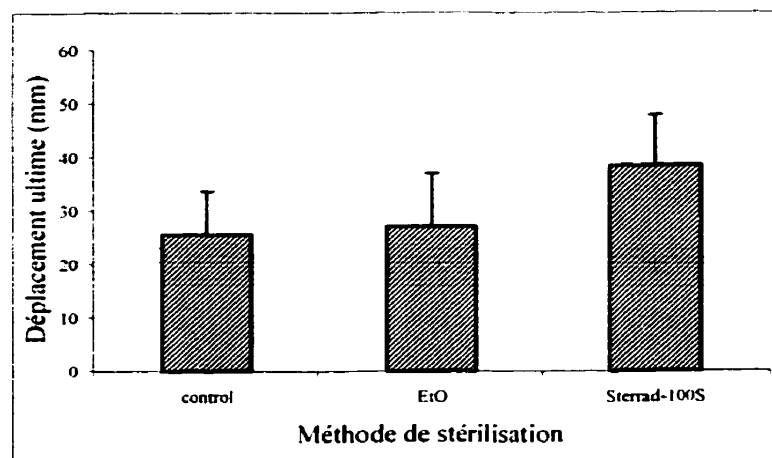


Figure 6.4 Effet de la stérilisation sur le déplacement ultime

(n = 8; Sterrad[®], p = 0.0109921; EtO, p = 0.74922059)

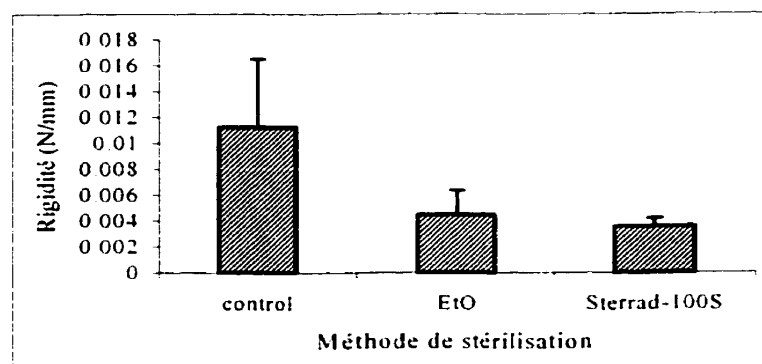


Figure 6.5 Effet des méthodes de stérilisation sur la rigidité

(n = 8; Sterrad[®], p = 0.00434476; EtO, p = 0.00779715)

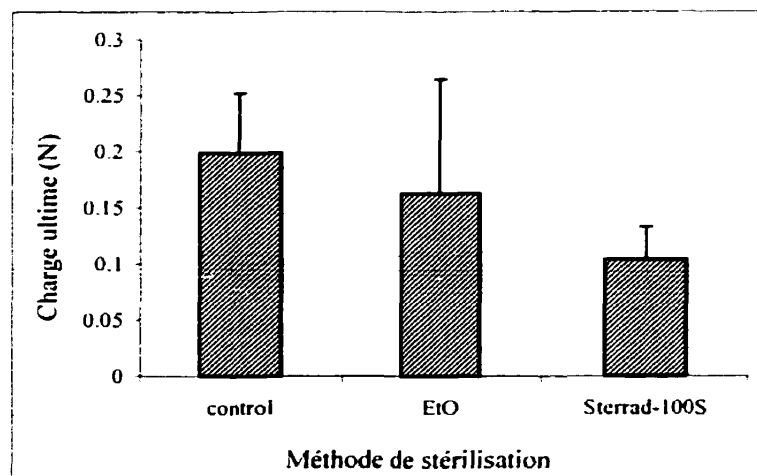


Figure 6.6 Effet des techniques de stérilisation sur la charge ultime.

(n = 8; Sterrad[®], p = 0.00113004; EtO, p = 0.39266122)

Les résultats obtenus permettent de constater que les techniques de stérilisation utilisées modifient les propriétés mécaniques. Leur affectation peut avoir des conséquences sur le comportement du matériau. Une relation a été établie entre le degré de gonflage et les propriétés mécaniques (Anseth et al., 1996). Elle peut conduire à modifier les cinétiques de libération de médicaments (Shah et al., 1996). Les résultats obtenus expliquent, en partie, la perte des propriétés de gonflage du complexe, lors de la stérilisation par un procédé oxydant tel que Sterrad[®].

6.4 DMTA

Les études de DMTA ont permis d'observer le module mécanique E' , et le module de la dissipation interne du matériau E'' (Figure 6.7 et 6.8). Le premier nous renseigne sur les propriétés mécaniques et constitue le rapport entre la tension et la déformation. Le deuxième constitue la partie imaginaire du module dynamique. Les analyses statistiques sur cette partie n'ont pas été effectuées à cause de l'insuffisance des échantillons.

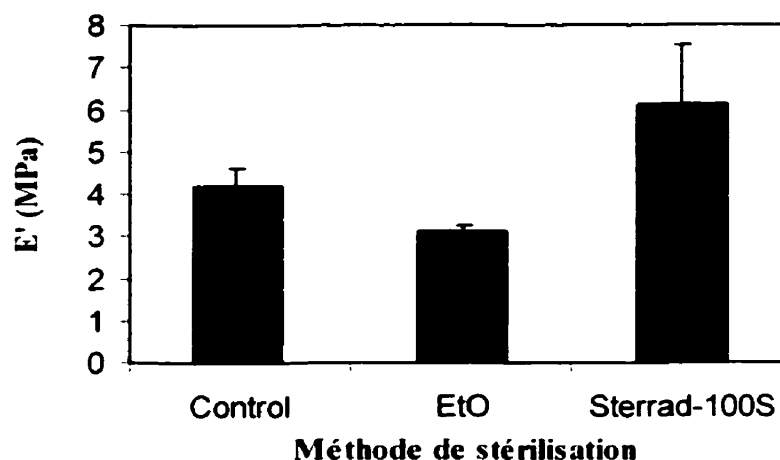


Figure 6.7 Influence de la stérilisation sur le module dynamique E' du Ch-X à 100°C

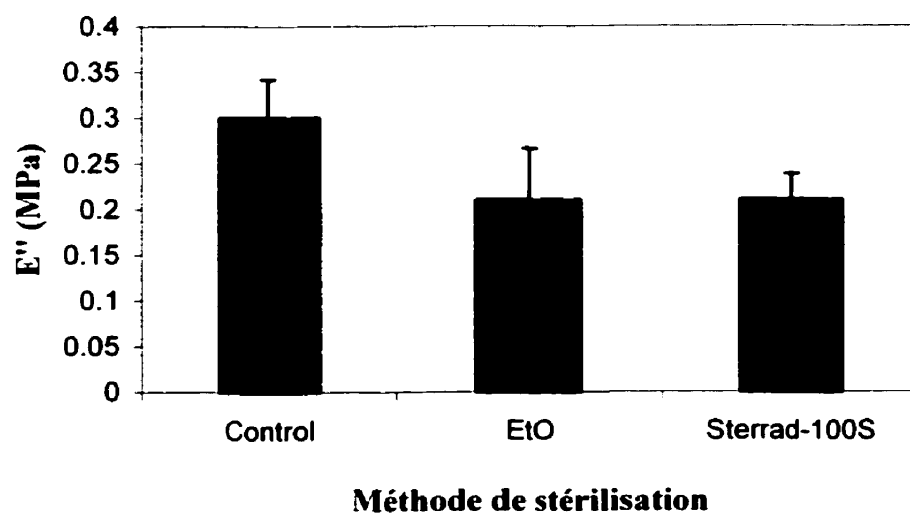


Figure 6.8 Influence de la stérilisation sur le module de perte E'' du Ch-X à 100°C

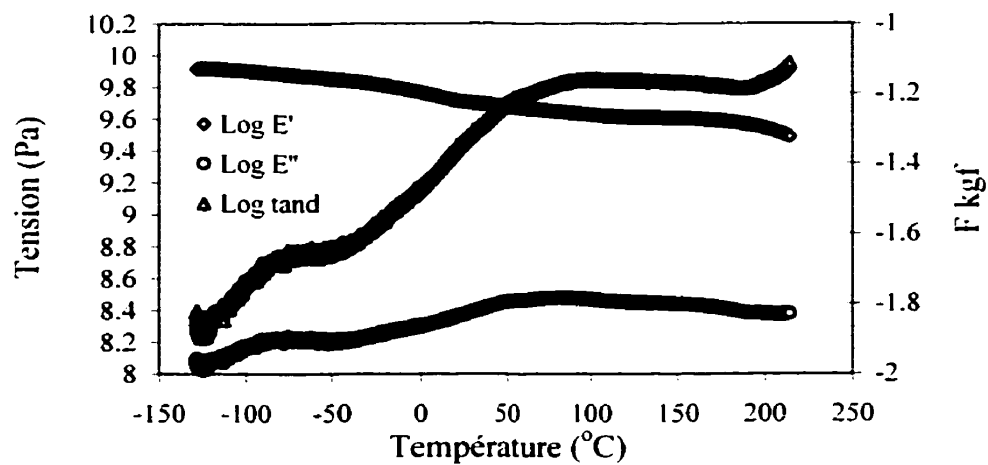


Figure 6.9 Courbes montrant la relaxation des films Ch-X non stérilisés

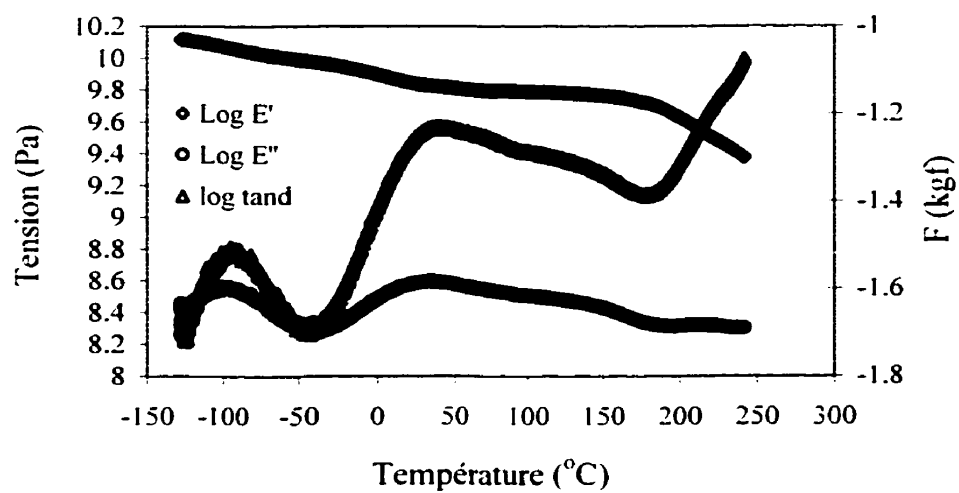


Figure 6.10 Courbes montrant la relaxation des films Ch-X stérilisés par Sterrad[®].

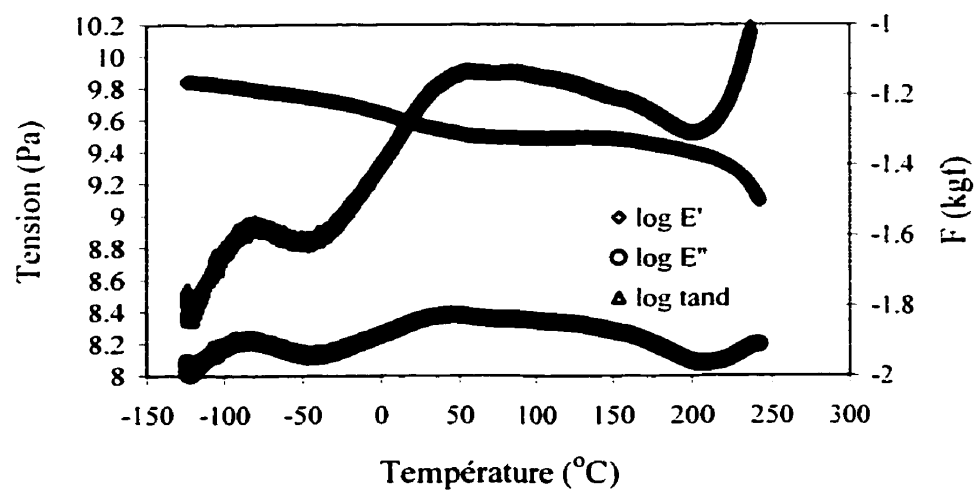


Figure 6.11 Courbes montrant la relaxation des films Ch-X stérilisés par oxyde d'éthylène.

6.5 Topographie

La stérilisation par oxyde d'éthylène semble légèrement modifier la surface des films. Un changement de la porosité des films semble évident sur les photos. Les « grains » semblent plus affinés mais l'aspect général est préservé. Quand à la stérilisation par plasma, elle semble n'avoir aucun effet sur la morphologie de surface (figure 6.9).

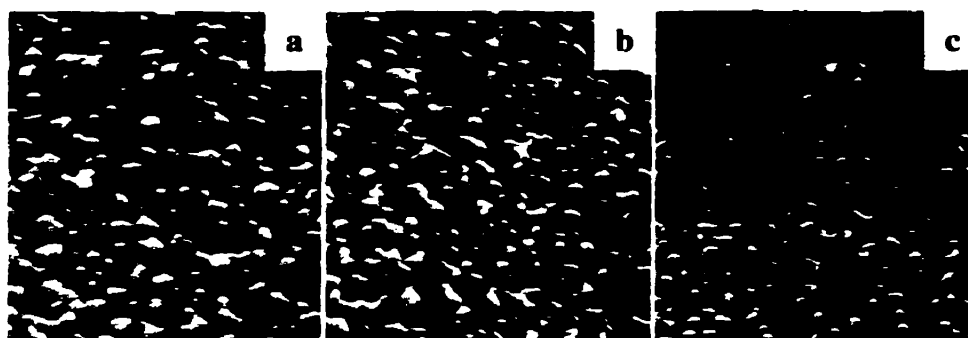


Figure 6.12 Effets de la stérilisation sur la topographie des films de Ch-X

(a : contrôle; b : stérilisation par Sterrad[®]; c : stérilisation par oxyde d'éthylène).

À la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les techniques de stérilisation utilisées affectent les propriétés physico-chimiques des films de chitosane-xanthane. Cependant, un point intéressant émerge quant à l'effet de l'oxyde d'éthylène sur la surface des films qui consiste à les rendre moins hydrophiles. Cette propriété peut jouer un rôle dans l'utilisation des films pour la régénération tissulaire. Par ailleurs, la diminution dans les propriétés mécaniques et l'augmentation des capacités de gonflage

permet une libération de médicaments plus rapide. Il peut être alors recommandé, selon l'application du complexe, de choisir un procédé de stérilisation qui améliore davantage ses propriétés. Les résultats de ces études seront l'objet d'un troisième article qui sera soumis dans le proche avenir.

Chapitre 7. Discussion générale et conclusions

Au cours de ce travail de maîtrise, nous nous sommes intéressés à l'étude du complexe Ch-X (ChitoxanTM) qui est un hydrogel polyionique ayant un intérêt considérable, notamment comme système de libération contrôlée de médicaments.

L'hydrogel a été synthétisé à l'université de Sherbrooke au département de génie chimique en 1993. Il a fait l'objet d'un dépôt de brevet en 1995 qui fût accordé en 1997 au Canada et aux Etats-Unis.

À date, très peu d'études, accessibles à la communauté scientifique sont disponibles à son propos. Cependant sa caractérisation et son utilisation, comme biomatériau candidat pour l'immobilisation d'enzymes sont reportées par Dumitriu et ses collaborateurs (1994, 1995, 1996, 1997, 1998). Au Japon, le groupe de Chu et ses collaborateurs ont étudié l'hydrogel pour immobilisation de cellules et pour ses capacités de gonflage (Chu et al., 1996; Ikeda et al., 1995).

Pour en savoir plus sur les propriétés biologiques de l'hydrogel, nous avons procédé à la détermination de sa biocompatibilité en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* pour déterminer son potentiel comme véhicule de médicaments dans le tract gastro-intestinal. L'étude de sa biodégradation est effectuée dans des milieux gastrique et intestinal simulés. Cette étude a aussi permis d'identifier ses produits de dégradation dans les différents milieux et d'établir sa cinétique en fonction du temps. Dans la troisième partie

du travail, nous avons procédé à la stérilisation de films de l'hydrogel par oxyde d'éthylène et plasma et déterminé leurs effets sur ses propriétés physico-chimiques.

7.1 Étude de la biocompatibilité

Dans cette partie, des particules de CH-X et leurs produits de dégradation sont utilisés pour examiner leur biocompatibilité *in vitro*. La biocompatibilité *in vivo* est déterminée en implantant des pastilles fabriquées à partir des particules de l'hydrogel, chez le rat Wistar en sous-cutané.

Des fibroblastes L-929 sont utilisés pour l'étude de cytotoxicité. Les cellules mises en contact avec les particules pendant 5 jours sont maintenues vivantes montrant que l'hydrogel ne provoque pas de toxicité. Cependant, à des concentrations de 5 et 10 mg/ml, une légère baisse de croissance est observée (figure 4.2). Nous pensons qu'elle serait plus liée à la pression exercée par les particules qu'à un effet de toxicité. Les produits de dégradation extraits après incubation des particules dans du milieu de culture pendant des périodes de 1 à 28 jours n'ont montré aucun signe de cytotoxicité quelque soit la concentration utilisée et le temps de dégradation (figure 4.3).

Les macrophages J-774 sont cultivés de la même façon, avec les particules et les produits de dégradation afin de déterminer l'effet stimulateur de l'hydrogel. Ces cellules sont

connues pour être responsables de la phagocytose et de l'induction de la réaction inflammatoire. La libération des cytokines, après stimulation, participe indirectement à la réparation tissulaire via la libération de cytokines. Lors de notre étude, les cytokines IL-1 β et TNF- α et l'oxyde nitreux sont dosés dans les surnageants cellulaires. Celles-ci sont connues pour leurs effets locaux et systémiques durant le processus inflammatoire et immunologique. Leur sécrétion est un signe de leur activation à la suite de leur interaction avec les polymères (Bonfield, et Anderson, 1993). Notre étude a montré que les macrophages cultivés en présence des particules de Ch-X produisent de l'IL-1 β avec un maximum déjà atteint avec la concentration de 0.1 mg/ml (figure 4.6). Les extraits des particules, par contre, n'ont pas montré l'induction de la production de cette cytokine (figure 4.7). Du moment que les particules possèdent une taille non phagocytable, leur composition et leur structure de surface a dû provoquer la stimulation des macrophages (Rae, 1986; Shanbhag et al., 1995). Shanbhag et al. (1992) ont suggéré que la stimulation des macrophages ne nécessite pas forcément l'internalisation des particules et que la simple interaction membrane-particule peut induire la réponse cellulaire.

La phagocytose est influencée par les propriétés de surface de l'hydrogel (Tabata et Ikada, 1990). Les particules utilisées lors de notre étude possèdent des propriétés hautement hydrophiliques qui pourraient contribuer à la stimulation des macrophages. En effet Nishimura et al., (1986) ont montré l'importance de l'hydrophilicité de sphères de la chitine déacétylée dans l'établissement de contact avec les macrophages et leur stimulation.

La sécrétion de TNF- α et d'oxyde nitreux est influencée de la même façon par les particules de Ch-X et leurs produits de dégradation avec une induction légèrement plus élevée pour le TNF- α (figures 4.4; 4.5; 4.8 et 4.9). Ceci pourrait trouver une explication dans le fait que la synthèse de l'oxyde nitreux est régulée de manière dose-dépendante par le TNF- α (Liversidge, 1994; Xie et al., 1992).

Les macrophages jouent aussi un rôle important à la suite de l'implantation d'un matériau *in vivo*. Ils participent à sa phagocytose et dégradation assurant son élimination. La réaction inflammatoire dont ils sont responsables est essentielle pour le recrutement des cellules qui vont procéder à la reconstruction tissulaire. Suite à la sécrétion des cytokines, les fibroblastes sont attirés et élaborent une nouvelle matrice. Après implantation de l'hydrogel, nous avons mis en évidence la présence de fibroblastes (figure 4.16) impliqués dans la synthèse du collagène attestant du processus de guérison (figure 4.11).

La biodégradation est influencée par la porosité des particules de Ch-X combinée à leur hydrophilicité et leur faibles propriétés mécaniques. Des constatations similaires ont été rapportées pour d'autres polymères (Pol et al., 1996).

Le processus inflammatoire peut aussi contribuer à la dégradation des particules à cause de l'acidification du site. Yomota et al., (1990) ont montré la dégradation préférentielle du chitosane dans des milieux acides. Nous avons démontré le même effet en utilisant un milieu gastrique simulé pour la dégradation du chitosane et des microsphères de Ch-X en comparaison avec des milieux physiologiques à pH neutre (Chellat et al., 1998).

Les pastilles de Ch-X se décomposent en particules qui se fragmentent révélant ainsi la dégradation de l'hydrogel. Les études de microscopie électronique à transmission montrent la phagocytose de ces fragments par les macrophages (figures 4.15 et 4.17).

L'implantation des particules est effectuée à court terme (1 semaine à 3 mois). Ces délais ne permettent pas de voir la résorption totale des pastilles implantées. Mais le processus de dégradation indique que la phagocytose conduirait à la disparition totale des particules à long terme.

En conclusion, les résultats des études histologiques ont montré la biodégradation du matériau par les macrophages sans provoquer de dommages au niveau des cellules après ingestion. Les études de microscopie électronique à transmission n'ont montré ni gonflement de mitochondries ni la présence de réticulum endoplasmique rugueux. De plus, la quantité de particules phagocytées n'ont conduit ni à la mort des cellules, ni à la libération du matériel cellulaire. Le recrutement de populations cellulaires responsables de la préparation et de la réparation tissulaire sont aussi observées. La diminution de la capsule fibreuse et l'absence de nécrose indiquent une bonne tolérance *in vivo*.

In vitro, les particules de l'hydrogel n'ont pas montré de cytotoxicité et stimulent les macrophages qui jouent un rôle dans sa biodégradation.

L'hydrophilicité, la haute porosité, permettent l'invasion par les cellules phagocytaires, la résorption et l'élimination de l'hydrogel. En plus, la biocompatibilité, *in vitro* et *in vivo*.

du complexe Ch-X et de ses produits de dégradation confère à celui-ci un bon potentiel comme candidat dans l'usage biomédical.

7.2 Étude de la biodégradation

La dégradation des polymères est un processus qui conduit à la scission des chaînes et la formation d'oligomères et monomères. Le terme « biodégradable » est utilisé pour les matériaux dont la dégradation est médiée par un système biologique (Vert et al., 1992).

L'étude de la biodégradation des microsphères de Ch-X est conduite par la détermination des produits de dégradation du chitosane, à savoir le glucosamine (GA) et le N-acétylglucosamine (N-Ac-GA) par HPLC (high performance liquid chromatography). Les milieux physiologiques utilisés sont le fluide gastrique et intestinal simulés (FGS et FIS) ainsi que le PBS (Phosphate Buffered Saline) comme contrôle. La concentration des particules dans les solutions est de 20 mg/ml. Le temps d'incubation s'est déroulé sur des périodes de 1, 7, 15 et 30 jours. Une étude parallèle de la biodégradation du chitosane est aussi effectuée à des fins comparatives entre ce dernier et le complexe.

En plus de la détection des produits de dégradation, nous avons procédé à l'analyse des particules, après dégradation, en utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB).

Les résultats ont montré que la dégradation se fait en deux étapes qui consistent en la formation d'oligomères de GA, suivie de la libération du N-Ac-GA. Le premier se trouve

être libéré à un taux maximal après 7 jours d'incubation du chitosane dans le le FGS et seulement après 15 jours dans le cas du complexe (figure 5.1). Une chute abrupte est observée après ces périodes pouvant être due à la décomposition du GA. Entre 15 et 30 jours, le N-Ac-GA est libéré pour atteindre un taux maximal à 30 jours (figure 5.3).

Tel que montré par le chromatogramme obtenu par HPLC, le N-Ac-GA est détecté après 7 jours dans le cas du chitosane dans le FIS. Pour le complexe, le pic correspondant est absent (figure 5.4). Ce qui suggère une dégradation différente pour le complexe par rapport au chitosane et dépendante du pH environnemental.

La formation des produits de dégradation dépend du temps et du milieu d'incubation. Le GA est libéré en premier, probablement à cause des groupements amines libres et plus accessibles à l'action hydrolytique du pH et des enzymes. La complexation avec le xanthane confère au chitosane des changements conformationnels qui le protègent de la dégradation rapide.

Le chitosane utilisé comme modèle de libération de médicaments a montré une dissolution rapide dans des milieux acides (Lorenzo et al., 1998). La complexation pourrait retarder la cinétique de dégradation grâce à la résistance du xanthane dans un large spectre de pH, contrairement aux autres polysaccharides possédant des fonctions carboxyliques (Talukdar et Plaizier-Vercammen, 1993). Cette propriété est conférée par la forme de la molécule et le grand nombre de liaisons hydrogène intermoléculaires (Cottrell et al., 1980).

Après comparaison de la dégradation du chitosane et du complexe, nous avons observé que le premier conduit à la formation de plus de GA dans le FGS par rapport au Ch-X, tel que montré par la figure 5.2. Dans le PBS, le taux de dégradation est très bas pour le chitosane et le complexe (figures 5.5 et 5.6). Nos résultats concordent avec ceux de Chandy et Sharma (1993) qui ont observé une dégradation rapide de microbilles de chitosane dans une solution de HCl (pH 2.0) par rapport au tampon salin (pH 7.4).

Le profil de dégradation du chitosane est différent dans le FGS et le FIS (figure 5.5). Quand au Ch-X, il se dégrade selon un même profil dans les fluides gastrique et intestinal, avec une légère augmentation dans le FGS (figure 5.6).

Il est important de signaler, par ailleurs, que :

- le GA est préférentiellement libéré dans le FGS (figure 5.1) alors que le N-Ac-GA est trouvé en plus grande proportion dans le FIS (figure 5.3).
- le N-Ac-GA est libéré en plus grande quantité à partir du chitosane par rapport au Ch-X dans les deux fluides simulés (figure 5.3).

Ceci indique l'influence du pH des différentes solutions sur le taux de dégradation et des fractions libérées.

La mesure cumulative des différents produits de dégradation, en fonction du temps, est présentée dans la figure 5.7 et met en évidence l'effet accélérateur du FGS sur la dégradation du chitosane et du complexe. De plus, le chitosane seul semble plus sensible

aux différents milieux de dégradation tout en suivant le même profil de cinétique de dégradation que le Ch-X et ce, quelque soit le milieu utilisé.

Les analyses par MEB ont confirmé la dégradation des microsphères dans le FGS et SIF en comparaison avec le PBS (figures 5.8 à 5.12). Les signes de dégradation dans le FGS sont révélés par la porosité croissante des microsphères, en fonction du temps (figures 5.9 à 5.11). Dans le FIS, une structure plus fibrillaire est observée témoignant de la dissociation des fibres d'origine (figure 5.12).

Lors de cette étude, nous avons démontré une dégradation plus rapide à pH acide. Ceci pourrait être relié au degré de gonflage, plus élevé des microsphères dans le FGS (Brondsted et Kopecek, 1992). En effet, Dumitriu et al. (1994) ont montré que les capacités de gonflage de l'hydrogel Ch-X augmentent avec la baisse du pH dans leur environnement.

En conclusion, les matrices biodégradables destinées à l'usage comme système de libération de médicaments peuvent être contrôlées par des facteurs chimiques, de diffusion et de gonflage (Linhardt, 1989). Dans le cas du Ch-X, ce dernier est d'une importance capitale. En fonction des facteurs environnementaux, tels la température, le pH et la force ionique, les propriétés de gonflage peuvent être modifiées. Ceci peut être réalisé en variant les caractéristiques chimiques du chitosane comme, le poids

moléculaire et le degré d'acétylation et finalement, concevoir un hydrogel capable de véhiculer des médicaments en fonction du site désiré.

Dans la présente étude, nous avons montré l'effet protecteur du xanthane, quand il est complexé avec le chitosane, dans des milieux simulants l'environnement gastro-intestinal. Nos résultats suggèrent que le Ch-X pourrait constituer un candidat potentiel comme système de libération de médicaments par voie orale.

7.3 Étude des effets de la stérilisation

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence les effets de la stérilisation par oxyde d'éthylène et par plasma Sterrad[®]100 sur les propriétés physico-chimiques des films de Ch-X.

Les propriétés étudiées sont : les propriétés de gonflage, l'énergie de surface, les propriétés mécaniques, ainsi que les analyses topographiques par microscopie électronique à balayage.

Les capacités de gonflage du complexe se trouvent diminuées d'environ 50% par rapport au contrôle après stérilisation par plasma. Par contre, l'oxyde d'éthylène semble n'avoir aucun effet sur cette caractéristique (figure 6.1). La diminution des capacités de gonflage serait due à de fortes ionisations conduisant à la dissociation des 2 chaînes de chitosane et de xanthane(Chu et al., 1995).

En étudiant l'énergie de surface, par mesure de l'angle de contact film-eau, nous avons observé son augmentation après stérilisation par oxyde d'éthylène. Contrairement, le plasma ne semble pas produire d'effet significatif (figure 6.2).

L'augmentation de l'angle de contact après stérilisation par oxyde d'éthylène semble indiquer une diminution de l'hydrophilicité des films. Des études effectuées par Smetana, (1993) et Pringle et Fletcher (1986) stipulent que l'attachement des cellules est inversement proportionnel à l'hydrophilicité de l'hydrogel. En nous basant là-dessus, nous pouvons nous attendre à ce que le changement provoqué par l'oxyde d'éthylène pourrait avoir une utilité dans l'utilisation de l'hydrogel comme support pour l'attachement et la croissance cellulaires (von Recum et al., 1998). Une application pour le traitement des brûlures serait alors envisageable.

Les analyses de la topographie des films par microscopie électronique à balayage montrent aussi un changement après stérilisation par oxyde d'éthylène qui se traduit par une diminution de la rugosité dont il faudrait explorer les effets sur les propriétés biologiques de l'hydrogel (figure 6.7).

Les propriétés mécaniques des films de l'hydrogel sont déterminées en effectuant des tests de traction. Les paramètres tels que le déplacement ultime (figure 6.4), la rigidité (figure 6.5), et la charge ultime (figure 6.6) sont mesurés.

Nous avons observé que la stérilisation par plasma provoque une augmentation de l'élasticité des films alors que l'oxyde d'éthylène ne semble pas avoir d'effet (figure 6.4).

La rigidité, quand à elle, diminue quelque soit la méthode de stérilisation (figure 6.5).

La charge ultime est celle à laquelle les films se cassent. Pour les deux techniques de stérilisation, sa diminution est notée (figure 6.6).

De par sa nature d'hydrogel, le complexe chitosane-xanthane est hautement hydrophile avec des propriétés de gonflage qui lui confèrent de très faibles propriétés mécaniques.

Les résultats obtenus permettent de constater que les techniques de stérilisation utilisées n'améliorent pas les propriétés mécaniques. Leur affectation peut avoir des conséquences sur le comportement du matériau. En effet, une relation a été établie entre le degré de gonflage et les propriétés mécaniques (Anseth et al., 1996). Elle peut aussi conduire à modifier les cinétiques de libération de médicaments (Shah et al., 1996).

À la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les techniques de stérilisation utilisées affectent les propriétés physico-chimiques des films de chitosane-xanthane. Cependant, un point intéressant émerge quant à l'effet de l'oxyde d'éthylène sur la surface des films qui consiste à les rendre moins hydrophiles. Cette propriété peut jouer un rôle dans l'utilisation des films pour la régénération tissulaire. Par ailleurs, la diminution dans les propriétés mécaniques et l'augmentation des capacités de gonflage permet une libération de médicaments plus rapide.

Finalement, il semblerait que l'effet de l'oxyde d'éthylène affecte les propriétés de surface alors que l'effet oxydant de la phase H_2O_2 de sterrad[®] a un effet plus en profondeur.

7.4 Perspectives

Ce travail de maîtrise a consisté à évaluer les propriétés biologiques d'un hydrogel, le Ch-X obtenu par la complexation de deux polymères biodégradables et dont plusieurs études ont conclu à leur biocompatibilité. Nous avons établi son absence de toxicité *in vitro* et une réaction à un corps étranger normale ainsi qu'une bonne biodégradation, *in vivo*.

Cependant, un seul type de chitosane est utilisé pour la formation du complexe. Il serait intéressant de voir les effets du degré d'acétylation et du poids moléculaire sur leur biocompatibilité et cinétique de biodégradation.

Des études sur les polymères biodégradables ont montré que le poids moléculaire et la composition sont des facteurs décisifs dans l'influence du taux de dégradation (Cutright et al., 1974; Gilding et Reed, 1979; Reed et Gilding, 1981). Des études *in vivo* ont montré la dégradation du chitosane ascorbate dans la cavité buccale après deux mois alors que des microsphères de chitosane réticulé n'ont pas subi de dégradation

significative après trois mois d'implantation, dans le muscle squelettique de rat (Muzzarelli et al., 1989; Jameela et Jayakrishnan, 1995).

Concernant la stérilisation, il serait plus adéquat de vérifier l'effet de l'oxyde d'éthylène sur les propriétés de surface et leur influence sur l'attachement cellulaire et leur croissance. Par contre, il faut être très prudent dans l'utilisation de cette méthode à cause de sa toxicité. Pour contourner ce désagrément, des temps assez longs d'aération doivent être observés. Mieux encore, il faudrait effectuer une étude pour déterminer le temps nécessaire à l'élimination des effets toxiques éventuels. Et ce, en considérant plusieurs formes de l'hydrogel : membranes, particules, microsphères, éponges, etc.

L'incorporation de substances actives et l'étude de leur cinétique de libération à partir de la matrice est l'étape ultime qui conduirait au développement d'un système de relargage contrôlé de médicament. Selon la vitesse de dégradation, des paramètres peuvent être variés au niveau du complexe, afin d'optimiser le système.

Références

AHLGREN, J.A. (1993). Characterization of xanthan gum degrading enzymes from heat-stable, salt-tolerant bacterial consortium. *Dev. Pet. Sci.*, **39**, 55-61.

ALAXAKIS, T., BOADI, D.K., QUONG, D., GROBOILLOT, A., O'NEIL, I., PONCELET, D., NEUFELD, R.J. (1995). Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and crosslinked chitosan microspheres for in vivo application. *Appl. Biochem. Biotech.*, **50**, 93-106.

ALLEMAN, E., LEROUX, J., GURNY, R., DOELKER, E. (1993). In vitro extended-release properties of drug-loaded poly (DL-lactic acid) nanoparticles, produced by salting out procedure. *Pharm. Res.*, **10**, 1732-1737.

ANSETH, K.S., BOWMAN, C.N., PEPPAS, L.B. (1996). Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, **17**, 1647-1657.

ANTONI, F., (1973). Manual on Radiation Sterilization of Medical and Biological Materials. *International Atomic Energy Agency*, (ed.), IAEA, Vienna.

ARCIDIACONO, S., KAPLAN, D.L. (1992). Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 281-286.

BARKLEY, D., FELDMANN, M., MAINI, R.N. (1989). The detection by immunofluorescence of distinct cell populations producing interleukin-1 in activated human peripheral blood. *J. Immunol. Methods*, **120**, 277-283.

BAWA, R., NANDU, M. (1990). Physico-chemical considerations in the development of an ocular polymeric drug delivery system. *Biomaterials*, **11**, 724-728.

BERTHOD, F., SAINTIGNY, G., CHRETIEN, F., HAYEK, D., COLLOMBEL, C., DAMOUR, O. (1994). Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clin. Mater.*, **15**, 259-265.

BONFIELD, T.L., ANDERSON, J.M. (1993). Functional versus quantitative comparison of IL-1 β from monocytes/macrophages on biomedical polymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1195-1199.

BONFIELD, T.L., COLTON, E.D. (1989). Plasma protein adsorbed biomedical polymers : activation of human monocytes and induction of interleukin-1. *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 535-548.

BRANDENBERG, G., LEIBROCK, L.G., SHUMAN, R., MALETTE, W.G., QUIGLEY, H. (1984). Chitosan: a new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue. *Neurosurgery*, **15**, 9-13.

BRONDSTED, H., KOPECEK, J. (1992). Hydrogels for site-specific drug delivery to the colon: in vitro and in vivo degradation. *Pharm. Res.*, **9**, 1540-1545.

CHANDY, T., SHARMA, C.P. (1993). Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials*, **14**, 939-944.

CHELLAT, F., TABRIZIAN, M., DUMITRIU, S., CHORNET, E., RIVARD C.-H., YAHIA, L'H. (1999). Study of biodegradation behavior of Chitosan-Xanthan microspheres in simulated physiological media. Soumis à *J. Biomed. Mater. Res.*

CHICKERING, D.E., JACOB, J.S., DESAI, T.A., HARRISON, M., HARRIS, W.P., MORRELL, C.N., CHATURVEDI, P., MATHIOWITZ, E. (1997). Bioadhesive microspheres : III. An in vivo transit and bioavailability study of drug-loaded alginate and poly(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres. *J. Control. Release*, **48**, 35-46.

CHOLLET, J.L., JOZWIAKOWSKI, M.J., PHARES, K.R., REITER, M.J., RODDY, P.J., SCHULTZ, H.J., TA., Q.V., TOMAI, M.A., (1999). Development of a topically active imiquimod formulation. *Pharm. Dev. Technol.*, **4**, 35-43.

CHRISTENSEN, B.E., KNUDSEN, K.D., SMIDSRØD, O., KITAMURA, S., TAKEO, K. (1993). Temperature-induced conformational transition in xanthans with partially hydrolyzed side chains. *Biopolymers*, **33**, 151-161.

CHRISTENSEN, B.E., MYHR, M., SMIDSRØD, O. (1996). Degradation of double-stranded xanthan by hydrogen peroxide in the presence of ferrous ions : comparison to acid hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, **280**, 85-99.

CHRISTENSEN, B.E., SMIDSRØD, O. (1996). Dependence of the content of unsubstituted (cellulosic) regions in prehydrolysed xanthans on the rate of hydrolysis by *Trichoderma reesei* endoglucanase. *Int. J. Biol. Macromol.*, **18**, 93-99.

CHRISTENSEN, B.E., SMIDSRØD, O., (1991). Hydrolysis of xanthan in dilute acid : Effects on chemical composition, conformation and intrinsic viscosity. *Carbohydr Res.*, **214**, 55-59.

CHU, C.-H., KUMAGAI, H., NAKAMURA, K. (1996). Application of polyelectrolyte complex gel composed of xanthan and chitosan to the immobilization of

Corynebacterium glutamicum. *J. Applied Polymer Science*, **60**, 1041-1047.

CHU, C.-H., SAKIYAMA, T., YANO, T. (1995). pH-sensitive swelling of a polyelectrolyte complex gel prepared from xanthan and chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 717-719.

CHUANG, W.Y., YOUNG, T.H., YAO, C.H., CHIU, W.Y. (1999). Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro. *Biomaterials*, **20**, 1479-1487.

CHUNG, L.Y., SCHMIDT, R.J., HAMLYN, P.F., SAGAR, B.F., ANDREWS, A.M., TURNER, T.D. (1994). Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture. *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 463-469.

COTTRELL, I.W., KANG, K.S., KOVAES, P. (1980). *Handbook of water soluble gums and resins*, Davidson, L., eds., McGraw -Hill Inc., Chapter 24. 1-7.

CRAIG, D.Q.M., TAMBURIC, S. (1997). Dielectric analysis of bioadhesive gel systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **44**, 61-70.

CUTRIGHT, D.E., PEREZ, B., BEASLEY, J.D., LARSON, W.J., ROSEY, W.R. (1974). Degradation rates of polymers and copolymers of polylactic and polyglycolic acids. *Oral Surg.*, **37**, 142-152.

DAVOUST, N., HANSSON, G. (1992). Identifying the conditions for development of beneficial mycelium morphology for chitosan producing-Absidia. *Appl. Microbiol.*, **36**, 618-620.

DENUZIERE, A., FERRIER, D., DAMOUR, O., DOMARD, A. (1998). Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials*, **19**, 1275-1285.

DILLON, G.P., YU, X., SRIDHARAN, A., RANIERI, J.P., BELLAMKONDA, R.V. (1998). The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 1049-1069.

DUMITRIU, S., CHORNET, E. (1996). Polyionic hydrogels as supports for enzyme immobilization, in *Chitin Enzymology*, R.A.A. Muzzarelli Ed., Atec Edizioni, Vol. 2, 527-541.

DUMITRIU, S., CHORNET, E. (1997). Immobilization of xylanase in chitosan-xanthan hydrogels. *Biotechnology Progress*, **13**, 539-545.

DUMITRIU, S., CHORNET, E. (1998). Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **31**, 223-246.

DUMITRIU, S., CHORNET, E., MORESOLI, C. (1995). Polyionic hydrogels as support for immobilization of lipase. *Biotechnology techniques*, **9**, 833-836.

DUMITRIU, S., MAGNY, P., MONTANÉ, D., VIDAL, P. F., CHORNET, E. (1994). Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan: Their properties as supports for enzyme immobilization. *J. Bioact. Compat. Polym.*, **9**, 184-209.

ELCIN, Y.M., DIXIT, V., GITNICK, G. (1998). Hepatocyte attachment on biodegradable modified chitosan membranes: in vitro evaluation for the development of liver organoids. *Artif. Organs*, **22**, 837-46.

ESER ELCIN, A., ELCIN, Y.M., PAPPAS, G.D. (1998). Neural tissue engineering: adrenal chromaffin cell attachment and viability on chitosan scaffolds. *Neurol. Res.*, **20**, 648-654.

FIEBRIG, I., HARDING, S.E., DAVIS, S.S. (1994). Sedimentation analysis of potential interactions between mucins and a putative bioadhesive polymer. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **94**, 66-73.

FIEBRIG, I., HARDING, S.E., ROWE, A.J., HYMAN, S.C., DAVIS, S.S. (1995). Transmission electron microscopy on pig gastric mucin and its interactions with chitosan. *Carbohydr. Polym.*, **28**, 239-244.

FUKAMIZO, T., OHKAWA, T., IKEDA, Y., GOTO, S. (1994). Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1205**, 183-188.

GASEROD, O., JOLLIFFE, I.G., HAMPSON, F.C., DETTMAR, P.W., SKJAK-BRAEK, G. (1998). The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. *Int. J. Pharm.*, **175**, 237-246.

GILDING, D.K., REED, A.M. (1979). Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo-and copolymers : 1. *Polymer*, **20**, 1459-1464.

GOMOTZ, W.R., WEE, S.F. (1997). Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **31**, 267-285.

GOSK, J., STANISZEWSKA-KUS, J., PALUCH, D., RUTOWSKI, R. (1992). Absorption of chitosan applied to polyester discs in rats after implantation. *Polim. Med.*, **22**, 43-52.

GÜVEN, O., AND SEN, M. (1991). Preparation and characterization of poly(N-vinyl 2-pyrrolidone) hydrogels. *Polymer*, **32**: 2491-2495.

HANG, Y.D. (1990). Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. *Biotechnol. Lett.*, **12**, 911-912.

HANSON, S., LALOR, P.A., NIEMI, S.M., NORTHUP, S.J., RATNER, B.D., SPECTOR, M., VALE, B.H., WILLSON, J.E. (1996). Testing Biomaterials in *Biomaterials Science*, Chapter 5, Academic Press Inc. p : 215-242.

HASSLER, R.A., DOHERTY, D.H.(1990). Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Prog.*, **6**, 182-187.

HIDAKA, Y., ITO, M., MORI, K., YAGASAKI, H., KAFRAWY, A.H. (1999). Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria. *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**, 418-423.

HIRANO, S., TSUCHIDA, H., NAGAO, N. (1989). N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials*, **10**, 574-576.

HIRANO, S., YAGI, Y. (1980). The effects of N-substitution of chitosan and the physical form of the products on the rate of hydrolysis by chitinase from *Streptomyces griseus*. *Carbohydr. Res.* **83**, 103-108.

HON D.N.-S. (1995). Chitin and chitosan : medical applications, in *Polysaccharides*, p : 631-649.

HOU, W.M., MIYAZAKI, S., TAKADA, M., KOMAI, T. (1985). Sustained release of indomethacin from chitosan granules. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3986-3992.

IKEDA, S., KUMAGAI, H., SAKIYAMA, T., CHU, C.-H., NAKAMURA, K. (1995). Method for analyzing pH-sensitive swelling of amphoteric hydrogels- Application to a polyelectrolyte complex gel prepared from xanthan and chitosan. *Biosci. Biotech., Biochem.*, **59**, 1422-1427.

INOUE, K., MACHIDA, Y., NAGAI, T. (1987). Sustained release tablets based on chitosan and carboxymethylcellulose sodium. *Drug. Des. Deliv.*, **1**, 297-305.

JAMEELA, S.R., JAYAKRISHNAN, A. (1995). Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*, **16**, 769-775.

JAMEELA, S.R., MISRA, A., JAYAKRISHNAN, A. (1994). Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs. *J. Biomater. Sci. Polymer*, **6**, 621-632.

JANSSON PE; KENNE L; LINDBERG B (1975). Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.*, **45**, 275-282

JIMÉNEZ-CASTELLANO, M.R., ZIA, H., RHODES, C.T. (1993). Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **19**, 143-194.

KARADAG, E., SARAYDIN, D., ÇETINKAYA, S., GÜVEN, O. (1996). In vitro swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogels. *Biomaterials*, **17**, 67-70.

KAWAKAMI, T., ANTOH, M., HASEGAWA, H., YAMAGISHI, T., ITO, M., EDA, S. (1992). Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste. *Biomaterials*, **13**, 759-763.

KIM, H.J., LEE, H.C., OH, J.S., SHIN, B.A., OH, C.S., PARK, R.D., YANG, K.S., CHO, C.S. (1999). Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **10**, 543-556.

KIM, S.W., BAE, Y.H., OKANO, T. (1992). Hydrogels : swelling, drug loading, and release. *Pharm. Res.*, **9**, 283-290.

KLOKKEVOLD, P.R., VANDEMARK, L., KENNEY, E.B., BERNARD, G.W. (1996). Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J. Periodontol.*, **67**, 1170-1175.

KONDO T; IRIE T; UEKAMA K (1996). Combination effects of alpha-cyclodextrin and xanthan gum on rectal absorption and metabolism of morphine from hollow-type suppositories in rabbits. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 280-286.

KOYANO, T., MINOURA, N., NAGURA, M., KOBAYASHI, K. (1998). Attachment and growth of cultured fibroblast cells on PVA/chitosan- blended hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 486-490.

KRATZ, G., ARNANDER, C., SWEDENBORG, J., BACK, M., FALK, C., GOUDA, I., LARM, O. (1997). Heparin-chitosan complexes stimulate wound healing in human skin. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.*, **31**, 119-123.

KUANG, Y., HOU, C., GOU, S. (1998). Experimental study of the effect on growth of Schwann cell from chitin and chitosan in vitro. *Chung Kuo Hsiu Fu Chung Chien Wai Ko Tsa Chih*, **12**, 90-93.

KUBOTA, N., KIKUCHI, Y. (1998). Macromolecular complexes of chitosan. In *Polysaccharides, Structural diversity and functional versatility*, Dumitriu, S. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 595-628.

KYOTANI, S., NISHIOKA, Y., OKAMURA, M., TANAKA, T., MIYAZAKI, M., OHNISHI, S., YAMAMOTO, Y., ITO, K., OGISO, T., TANADA, S., et al. (1992). A study of embolizing materials for chemo-embolization therapy of hepatocellular carcinoma: antitumor effect of cis- diamminedichloroplatinum(II) albumin microspheres, containing chitin and treated with chitosan on rabbits with VX2 hepatic tumors. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2814-2816.

LEHR, C.M. (1994). Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **11**, 119-160.

LEO, W.J., MCLOUGHLIN, A.J., MALONE, D.M. (1990). Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. *Biotechnol. Prog.*, **6**, 51-53.

LIM, L.Y., KHOR, E., KOO, O. (1998). Gamma irradiation of chitosan. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, **43**, 282-290.

LIM, L.Y., KHOR, E., LING, C.E. (1999). Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, **48**, 111-116.

LIM, L.Y., WAN, L.S.C. (1995). Heat treatment of chitosan films. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21**, 839-846.

LINHARDT, R.J. (1989) Biodegradable polymers for controlled release of drugs. in *Controlled release of drugs : Polymers and Aggregate Systems*, M. Rosoff (ed.), VCH publishers, New York, 53-95.

LIVERSIDGE, J., GRABOWSKI, P., RALSTON, S., BENJAMIN, N., FORRESTER, J.V. (1994). Rat retinal pigment epithelial cells express an inducible form of nitric oxide synthase and produce nitric oxide in response to inflammatory cytokines and activated T cells. *Immunology*, **83**, 404-409.

LORENZO-LAMOSA, M.L., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. (1998). Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J. Control. Release*, **52**, 109-118.

MATSUBARA, M., KURODA, H. (1991). Isolation and physiological activity of the chitosan from conidia and mycelia of *Mycosphaerella pinodes*. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1484-1488.

MATSUMOTO, T., KAWAI, M., MASUDA, T. (1993). Rheological properties and fractal structure of concentrated polyion complexes of chitosan and alginate. *Biorheology*, **30**, 435-441.

MELTON LD; MINDT L; REES DA; SANDERSON GR (1976). Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. *Carbohydr. Res.*, **46**, 245-257.

MIGUEZ, M.J., RODRIGUES, B.C., SANCHEZ, M. DE N., LARANJEIRA, M.C. (1997). Preparation and scanning electronic microscopy study of chitosan/polyvinyl (alcohol)-encapsulated crude urease extract. *J. Microencapsul.*, **14**, 639-646.

MILLER, K.M., ANDERSON, J.M. (1988). Human monocyte/macrophage activation and interleukin-1 generation by biomedical polymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, **22**, 713-731.

MILLER, K.M., ROSE-CAPRARA, V., ANDERSON, J.M. (1989). Generation of IL1-

MITTAL, S., COHEN, A., MAYSINGER, D. (1994). In vitro effects of brain derived neurotrophic factor released from microspheres. *Neuroreport.* **5**, 2577-2582.

MIYAZAKI, S., ISHII, K., NADAI, T. (1981). The use of chitin and chitosan as drug carriers. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3067-3069.

MIYOSHI, H., SHIMURA, K., WATANABE, K., ONODERA, K. (1992). Characterization of some fungal chitosans. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1901-1905.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.

MUZZARELLI, R., BIAGINI, G., PUGNALUNI, A., FILIPPINI, O., BALDASSARRE, V. (1989). Reconstruction of paradontal tissue with chitosan. *Biomaterials*, **10**, 598-603.

MUZZARELLI, R.A., BIAGINI, G., BELLARDINI, M., SIMONELLI, L., CASTALDINI, C., FRATTO, G. (1993a). Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery. *Biomaterials*, **14**, 39-43.

MUZZARELLI, R.A., MATTIOLI-BELMONTE, M., TIETZ, C., BIAGINI, R., FERIOLI, G., BRUNELLI, M.A., FINI, M., GIARDINO, R., ILARI, P., BIAGINI, G.

(1994). Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*, **15**, 1075-1081.

MUZZARELLI, R.A., TANFANI, F., EMANUELLI, M., PACE, D.P., CHIURAZZI, E., PIANI, M. (1984). Sulfated N-(carboxymethyl)chitosans: novel blood anticoagulants. *Carbohydr. Res.*, **126**, 225-231.

MUZZARELLI, R.A., ZUCCHINI, C., ILARI, P., PUGNALONI, A., MATTIOLI-BELMONTE, M., BIAGINI, G., CASTALDINI, C. (1993b). Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chitosan in an animal model. *Biomaterials*, **14**, 925-929.

MUZZARELLI, R.A.A. (1985). Chitin, in *The Polysaccharides*, Aspinall, G.O. ed., Academic Press, New York, 417-450.

MUZZARELLI, R.A.A., MUZZARELLI, B. (1998). Structural and functional versatility of chitins. In *Polysaccharides, Structural diversity and functional versatility*, Dumitriu, S. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 569-594.

NEEDLEMAN, I.G., MARTIN, G.P., SMALES, F.C. (1998). Characterisation of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J. Clin. Periodontol.*, **25**, 74-82.

NEEDLEMAN, I.G., SMALES, F.C., MARTIN, G.P. (1997). An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J. Clin. Periodontol.*, **24**, 394-400.

NISHIMURA, K., NISHIMURA, S., SEO, H., NISHI, N., TOKURA, S., AZUMA, I. (1986). Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin. *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, 1359-1372.

OGAWA, K. (1991). Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the cristallinity and polymorphs. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2375-2379.

PAL, A.K., PAL, T.K., MUKHERJEE, K., PAL, S. (1997). Animal experimentation with tooth derived calcium hydroxyapatite based composites as bone-graft substitute Biomaterials. *Biomed. Sci. Instrum.*, **33**, 561-566.

PELUSO, G., PETILLO, O., RANIERI, M., SANTIN, M., AMBROSIO, L., CALABRO, D., AVALLONE, B., BALSAMO, G. (1994). Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*, **15**, 1215-1220.

PEPPAS, N.A., BURI, P.A. (1985). Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Control. Release*, **2**, 257-275.

POL, B.J., VAN WACHEM, P.B., VAN LUYN, M.J., VAN DER DOES, L., BANTJES, A. (1996). In vivo testing of crosslinked polyethers.I. Tissue reaction and biodegradation. *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 307-320.

POLK, A., AMSDEN, B., DE YAO, K., PENG, T., GOOSEN, M.F. (1994). Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *J. Pharm. Sci.*, **83**, 178-185.

PRINGLE, J.H., FLETCHER, M. (1986). Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 1321-1325.

RAE, T. (1986). The macrophage response to implant materials-with special reference to those used in orthopaedics. *Crit. Rev. Biocompat.*, **2**, 97-126.

RANE, K.D., HOOVER, D.G. (1993). Production of chitosan by fungi. *Food Technol.*, **7**, 11-33.

RAO, S.B., SHARMA, C.P. (1995).: Sterilization of chitosan: implications. *J. Biomater. Appl.*, **10**:136-143.

RASERO, L.J., SKAUEN, D.M. (1967). Effect of gamma radiation on selected pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.*, **56**, 724-728.

REED, A.M., GILDING, D.K. (1981). Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo-and copolymers : 2. In vitro degradation. *Polymer*, **22**, 494-498.

RICHARDSON, S.C., KOLBE, H.V., DUNCAN, R. (1999). Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int. J. Pharm.*, **178**, 231-243.

RUISSEN A.L., VAN DER REIJDEN W.A., VAN'T HOF W., VEERMAN E.C., NIEUW AMERONGEN A.V. (1999). Evaluation of the use of xanthan as vehicle for cationic antifungal peptides. *J Controlled Release*, **60**: 49-56

SHAH, N.H., RAILKAR, A.S., PHUAPRADIT, W., ZENG, F.W., CHEN, A., INFELD, M.H., MALICK, A.W. (1996). Effect of processing techniques in controlling the release rate and mechanical strength of hydroxypropyl methylcellulose based hydrogel matrices. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **42**, 183-187.

SHANBHAG, A.S., JACOBS, J.J., GLANT, T.T. (1995). Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro. *J. Orthop. Res.*, **13**, 792-801.

SHANBHAG, A.S., YANG, J., LILIEN, J., BLACK, J. (1992). Decreased neutrophil

respiratory burst on exposure to cobalt-chrome alloy and polystyrene in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 185-195.

SHATWELL, K.P., SUTHERLAND, I.W., ROSS-MURPHY, S.B. (1990). Influence of acetyl and pyruvate substituents on the solution properties of xanthan polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**, 71-78.

SINTZEL, M.B., MERKLI, A., TABATABAY, C., GURNY, R. (1997). Influence of irradiation sterilization on polymers used as drug carriers- a review. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **23**, 857-878.

SMETANA, K. Jr. (1993). Cell biology of hydrogels. *Biomaterials*, **14**, 1046-1050.

STANKOWSKI, J.D., MUELLER, B.E., ZELLER, S.G. (1993). Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. *Carbohydr Res.*, **241**, 321-326.

STOKKE, B.T., FOSS, P., CHRISTENSEN, B.E., KIERULF, C., SUTHERLAND, I.W. (1989). Long-term storage of xanthan in seawater at elevated temperature: physical dimensions and chemical composition of degradation products. *Int. J. Biol. Macromol.*, **11**, 137-144.

STOLBERG, J., LARANJEIRA, M.C., SANCHEZ, M.N., KLUG, M., FAVERE, V.T. (1999). Microspheres of chitosan/poly(vinylalcohol) incorporating tetrasulphonated copper (II) phthalocyanine: preparation and characterization. *J. Microencapsul.*, **16**, 431-438.

SUGIMOTO, K., YOSHIDA, M., YATA, T., HIGAKI, K., KIMURA, T. (1998). Evaluation of poly(vinyl alcohol)-gel spheres containing chitosan as dosage form to control gastrointestinal transit time of drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1202-1206.

SUTHERLAND, I.W. (1984). Hydrolysis of unordered xanthan in solution by fungal cellulases. *Carbohydr. Res.*, **131**, 93-98.

TABATA, Y., IKADA, Y. (1990). Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. *Adv. Polym. Sci.*, **94**, 107-141.

TAIT, M.I., SUTHERLAND, I.W. (1989). Synthesis and properties of a mutant type of xanthan. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 457-462.

TAKAYAMA, K., HIRATA, M., MACHIDA, Y., MASADA, T., SANNAN, T., NAGAI, T. (1990). Effect of interpolymer complex formation on bioadhesive property and drug release phenomenon of compressed tablet consisting of chitosan and sodium hyaluronate. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1993-1997.

TAKEUCHI, H., YAMAMOTO, H., NIWA, T., HINO, T., KAWASHIMA, Y. (1996). Enteral absorption of insulin in rat from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm. Res.*, **13**, 896-900.

TAKKA, S., ACARTURK, F. (1999). Calcium alginate microparticles for oral administration: I: Effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency. *J. Microencapsul.* **16**, 275-290.

TALUKDAR, M., PLAIZIER-VERCAMMEN, J. (1993). Evaluation of xanthan gum as a hydrophilic matrix for controlled-release dosage form preparations. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **19**, 1037-1046.

TALUKDAR, M.M., KINGET, R. (1997). Comparative study on xanthan gum and hydroxypropylmethyl cellulose as matrices for controlled-release drug delivery. II. Drug diffusion in hydrated matrices. *Int. J. Pharm.*, **151**, 99-107.

TALUKDAR, M.M., ROMBAUT, P., KINGET, R. (1998). The release mechanism of an oral controlled-release delivery system for indomethacin. *Pharm. Dev. Technol.*, **3**, 1-6.

TARAVEL, M.N., DOMARD, A. (1996). Collagen and its interactions with chitosan. III some biological and mechanical properties. *Biomaterials*, **17**, 451-455.

TEMPIO, J.S., ZATZ, J.L. (1981). Interaction of xanthan gum with suspended solids. *J. Pharm. Sci.*, **70**, 554-558.

TOFFEY, A., SAMARANAYAKE, G., FRAZIER, C.E., GLASSER, W.G. (1996). Chitin derivatives I. Kinetics of the heat-induced conversion of chitosan to chitin. *J. Appl. Polym. Sci.*, **60**, 75-85.

UEKAMA, K., KONDO, T., NAKAMURA, K., IRIE, T., ARAKAWA, K., SHIBUYA, M., TANAKA, J. (1995). Modification of rectal absorption of morphine from hollow-type suppositories with a combination of alpha-cyclodextrin and viscosity- enhancing polysaccharide. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 15-20.

USP XXII. Biological evaluation of medical devices_Part 9 (1995). Degradation of materials related to biological testing. In *Association for the Advancement of Medical Instrumentation*. Technical Information Report No. 10993, 141-221.

VERT, M., FEIJEN, J., ALBERTSON, A., SCOTT, G., CHIELLINI, E. (1992). *Degradable polymers and plastics*. Redwood Press Ltd., UK. 73-92.

VOLLAND, C., WOLFF, M., KISSEL, T. (1994). The influence of terminal gamma sterilization on captopril containing poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. control. release*, **31**, 293-305.

VON RECUM, H.A., KIM, S.W., KIKUCHI, A., OKUHARA, M., SAKURAI, Y., OKANO, T. (1998). Novel thermally reversible hydrogel as detachable cell culture substrate. *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 631-639.

WILLIAMS, D.F. (1987). Definitions in biomaterials. D.F. Williams Ed. Amsterdam: Elsevier.

WITSCHI, C., MRSNY, R.J. (1999). In vitro evaluation of microparticles and polymer gels for use as nasal platforms for protein delivery. *Pharm. Res.*, **16**, 382-390.

WU, D., ZHAO, D. (1997). Tissue engineering study on repairment of injured nerve gap in rat. *Sheng Wu I Hsueh Kung Cheng Hsueh Tsa Chih.*, **14**, 108-110.

XIE, Q.W., CHO, H.J., CALAYCAY, J., MUMFORD, R.A., SWIDEREK, K.M., LEE, T., DING, A., TROSO, T., NATHAN, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, **256**, 225-228.

YOMOTA, C., KOMURO, T., KIMURA, T. (1990). Studies on the degradation of

chitosan films by lysozyme and release of loaded chemicals. *Yakugazu-Zasshi*. **110**, 442-448.

ZAHRAOUI, C., SHARROCK, P. (1999). Influence of sterilization on injectable bone biomaterials. *Bone*. **25**, 63S-65S.

ZATZ, J.L., KNAPP, S. (1984). Viscosity of xanthan gum solutions at low shear rates. *J. Pharm. Sci.* **73**, 468-471.

ZIELINSKI, B.A., AEBISCHER, P. (1994). Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. *Biomaterials*. **15**, 1049-1056.